

9. Előadás

Fehérjék

Előzmények



Peptidkémia

1901 E. Fischer : Gly-Gly

1932 Max Bergman és
Leonidas Zervas :
Benziloxi-karbonil csoport

1963 B. Merrifield :
Szilárd fázisú peptid
szintézis

1988 Á. Furka :
Kombinatorikus peptid
szintézis

Analitikai kémia

1923
Fritz Pregl :
Mikroanalitika

Kromatográfia

Elektroforézis

Röntgen (X-ray)
krisztallográfia

NMR

Tömeg
spektroszkópia

Protein kémia

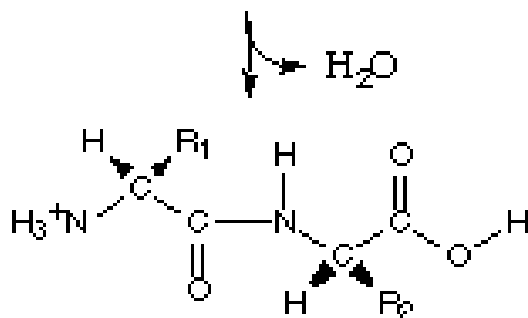
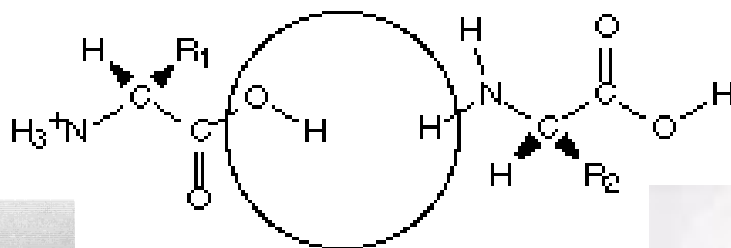
1952
William H. Stein és
Stanford Moore :
Aminosav analízis

1954 P. Edman :
Protein
szekvenálás

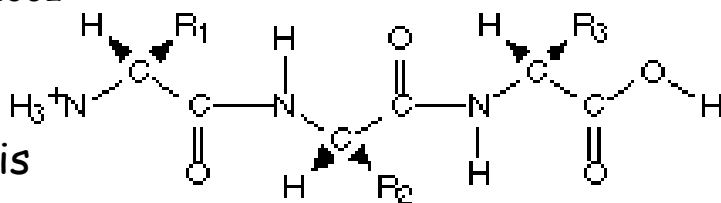
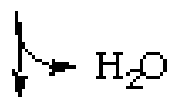
1955 F. Sanger :
Az inzulin primér
szerkezete

1962 M.F. Perutz és
J. C. Kendrew
A myoglobin
tér szerkezete

A peptid kötés: amid kötés (E. Fischer, 1902)



+ aa3



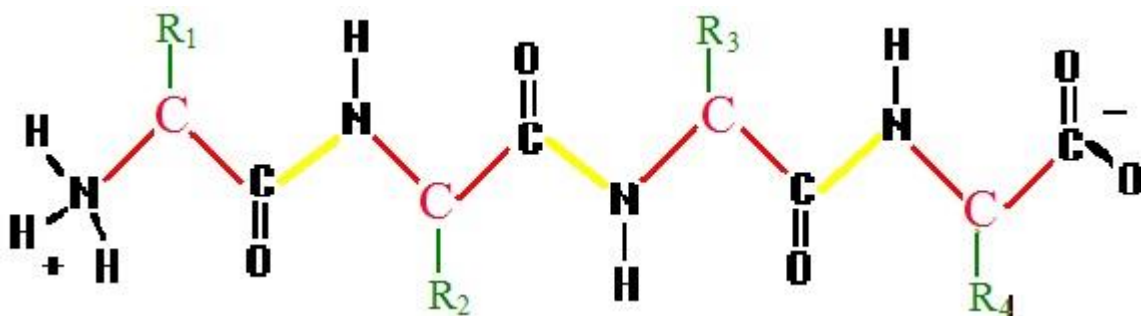
N-terminális

John B. Fenn
Nobel díj, 2002

etc...

C-terminális

Dipeptid: 2 Oligopeptid : 2-15 Polipeptid: >15



poliamid



Emil Fischer
Nobel díj, 2002



Kötéstípusok a fehérjékben

Kovalens

Amid

- CO - NH -

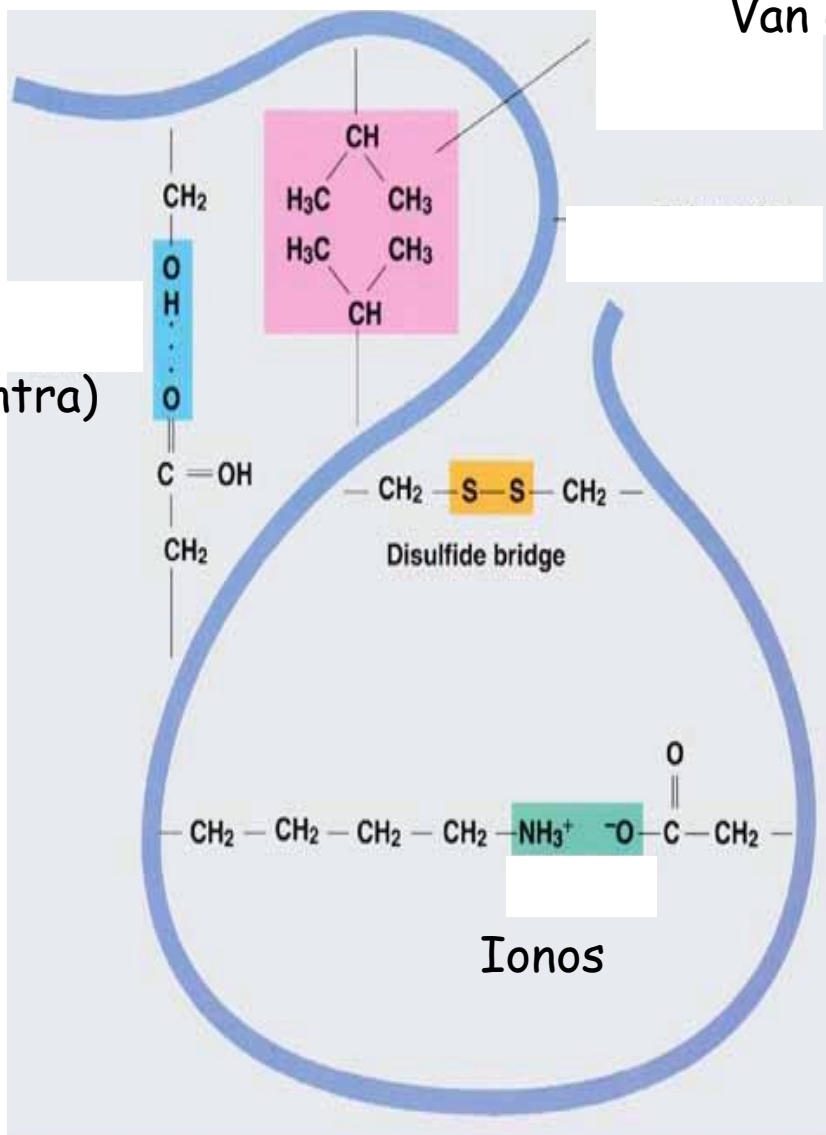
Diszulfid

- S - S -

Nem kovalens

Hidrofób,
Van der Waals

H-híd
(inter és intra)

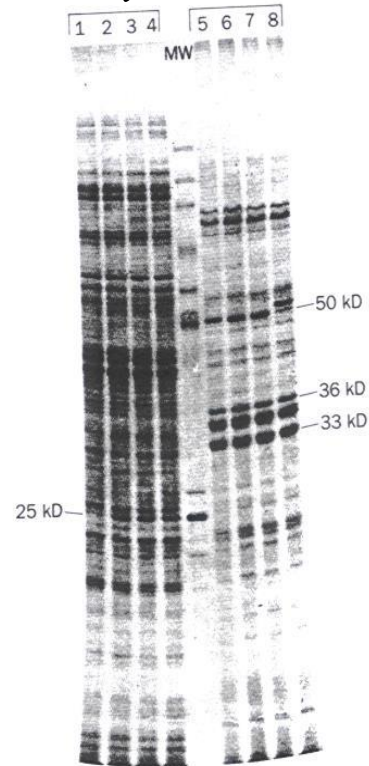
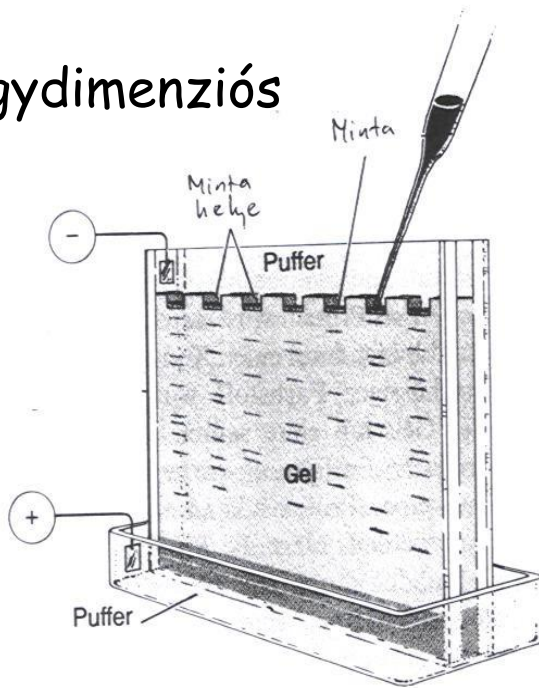


Fehérjék szerkezetének meghatározása

1. Izolálás, tisztítás - homogén minta előállítása
2. Kimutatás, minőségi/mennyiségi meghatározás
3. Primer (elsődleges) szerkezet meghatározása
 - aminosavösszetétel
 - aminosavsorrend
 - N-terminális aminosav
 - C-terminális aminosav
4. Térszerkezet (3D) meghatározása
 - szekunder (másodlagos)
 - terciér (harmadlagos, szupermásodlagos)
 - quaterner (negyedleges)

1. Fehérje izolálás - gélelektroforézis (egy- és kétdimenziós)

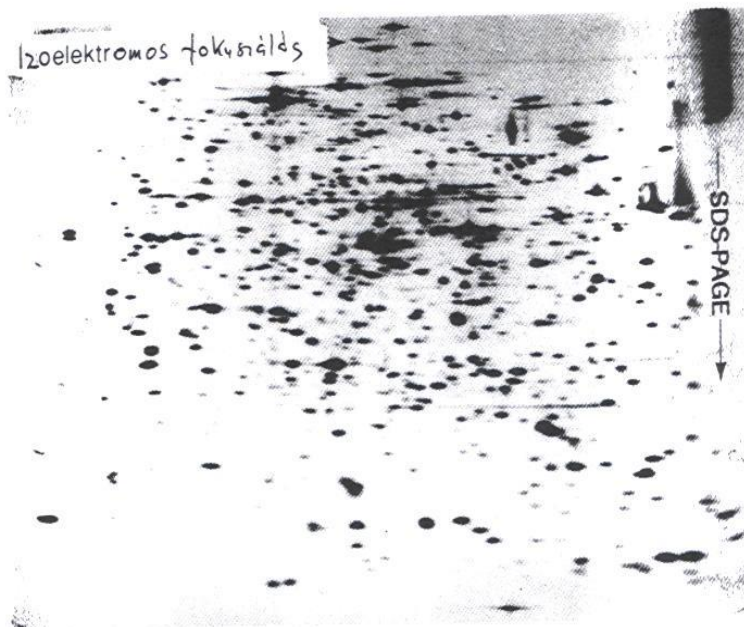
egydimenziós



Salmonella thyphimurium

kétdimenziós

SDS-PAGE, 200 μ g protein, 3,5 x 0,8 cm



Autoradigram, 2D, *E. Coli* proteinek, 10 μ g,
 14 C jelzett aminosav a táptalajban, 2,3 x 1,3 cm, exp. 825 h

Gélelektroforézis

Gél készítése
Mintaelőkészítése

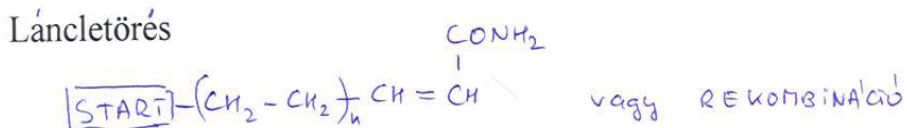
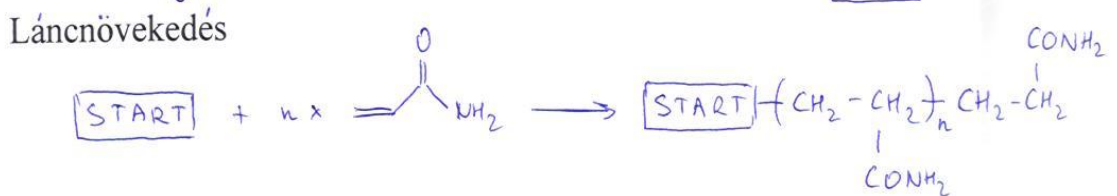
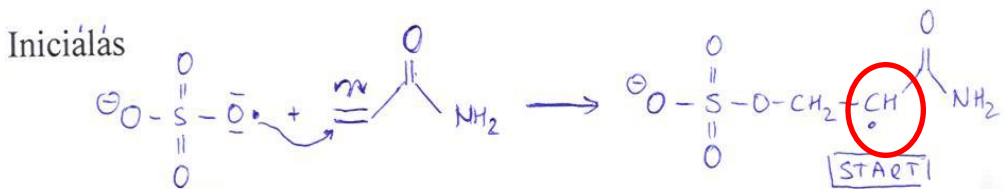
Elektroforetikus elválasztás

A komponensek kimutatása, dokumentálás

A gél komponensei

Vegyület neve	Képlet	Feladat
akrilamid		polimerláncok
N,N'-metilén-bis-akrilamid		keresztkötés
N,N,N',N' - tetrametilén-eten-diamin (TEMED)		gyökfogó
ammónium perszulfat		iniciátor

A reakció

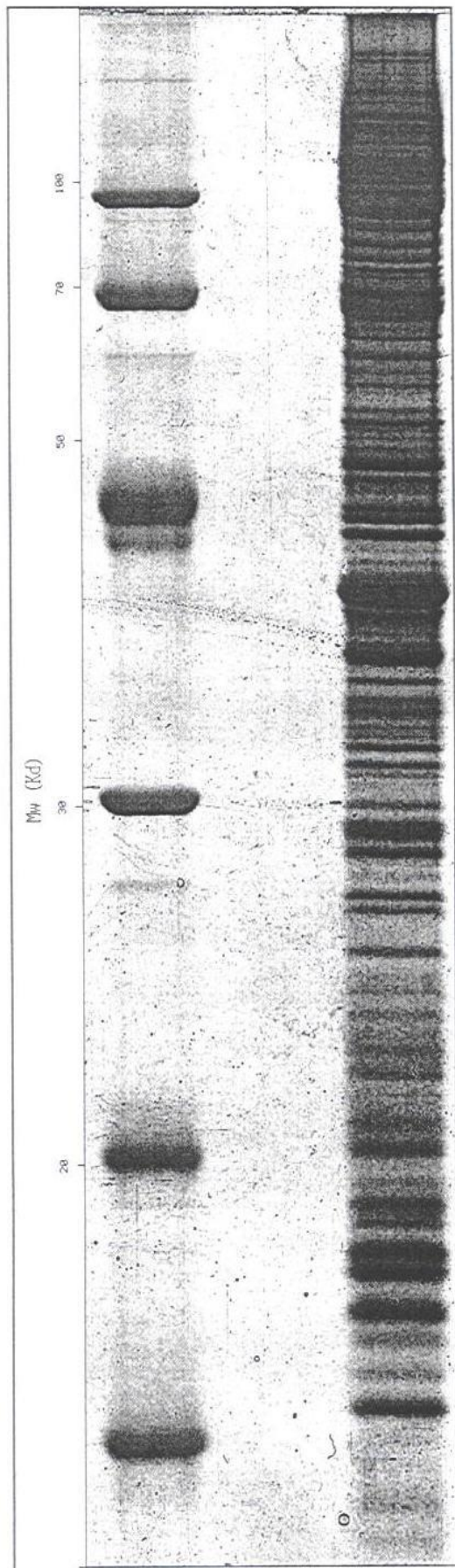


Egydimenziós gélelektroforézis

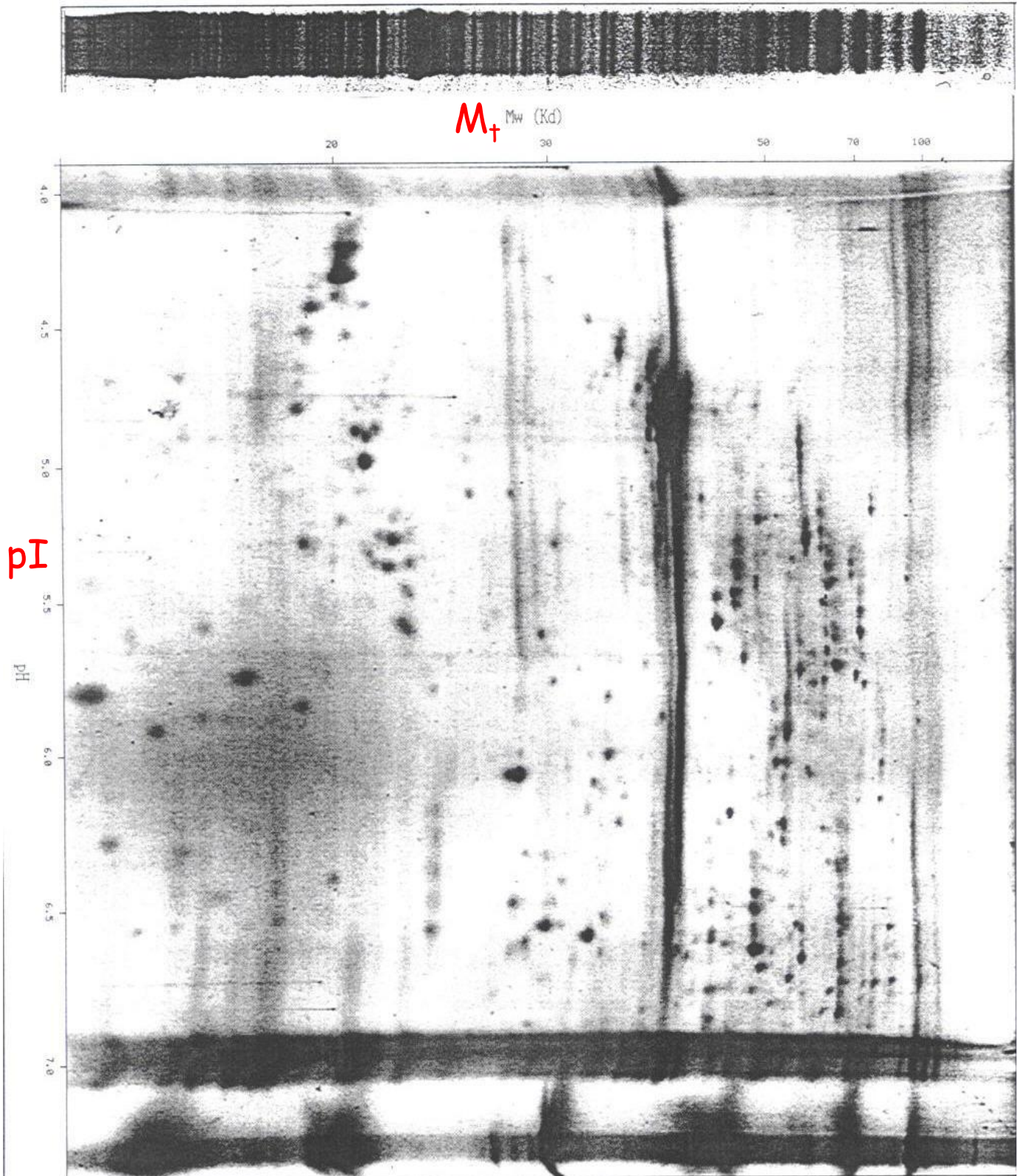
(méret szerint)

HeLa sejtmag
fehérjék

Swiss-Prot



Kétdimenziós gélelektroforézis (HeLa sejtmag fehérjék)



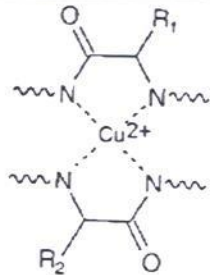
2. Fehérjék kimutatása, mennyiségi meghatározása

a) Amino csoport kimutatás

b) Biuret próba

Reagens: $\text{CuSO}_4/\text{NaOH}$

$\lambda = 540-550 \text{ nm}$



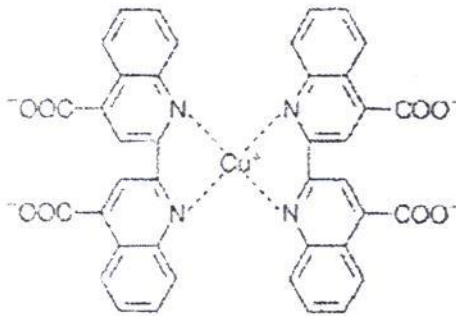
c) Lowry-Hartree

Reagens: biuret +

$3 \text{ H}_2\text{O} \times \text{P}_2\text{O}_5 \times 13 \text{ WO}_2 \times 5 \text{ MoO}_3$
 $10 \text{ H}_2\text{O}$, Folin-Ciocalteu-fenol

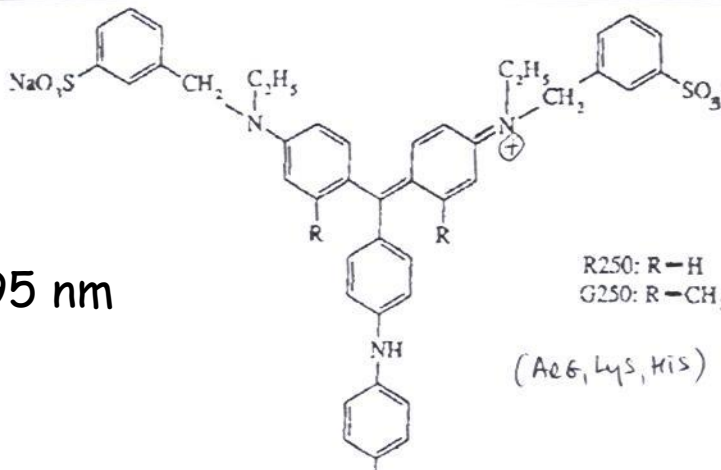
$\lambda = 720-750 \text{ nm}$

d) BCA (bicinoninic acid), Reagens: biuret + BCA



$\lambda = 562 \text{ nm}$

e) Bradford reagens (trifenil-metion)



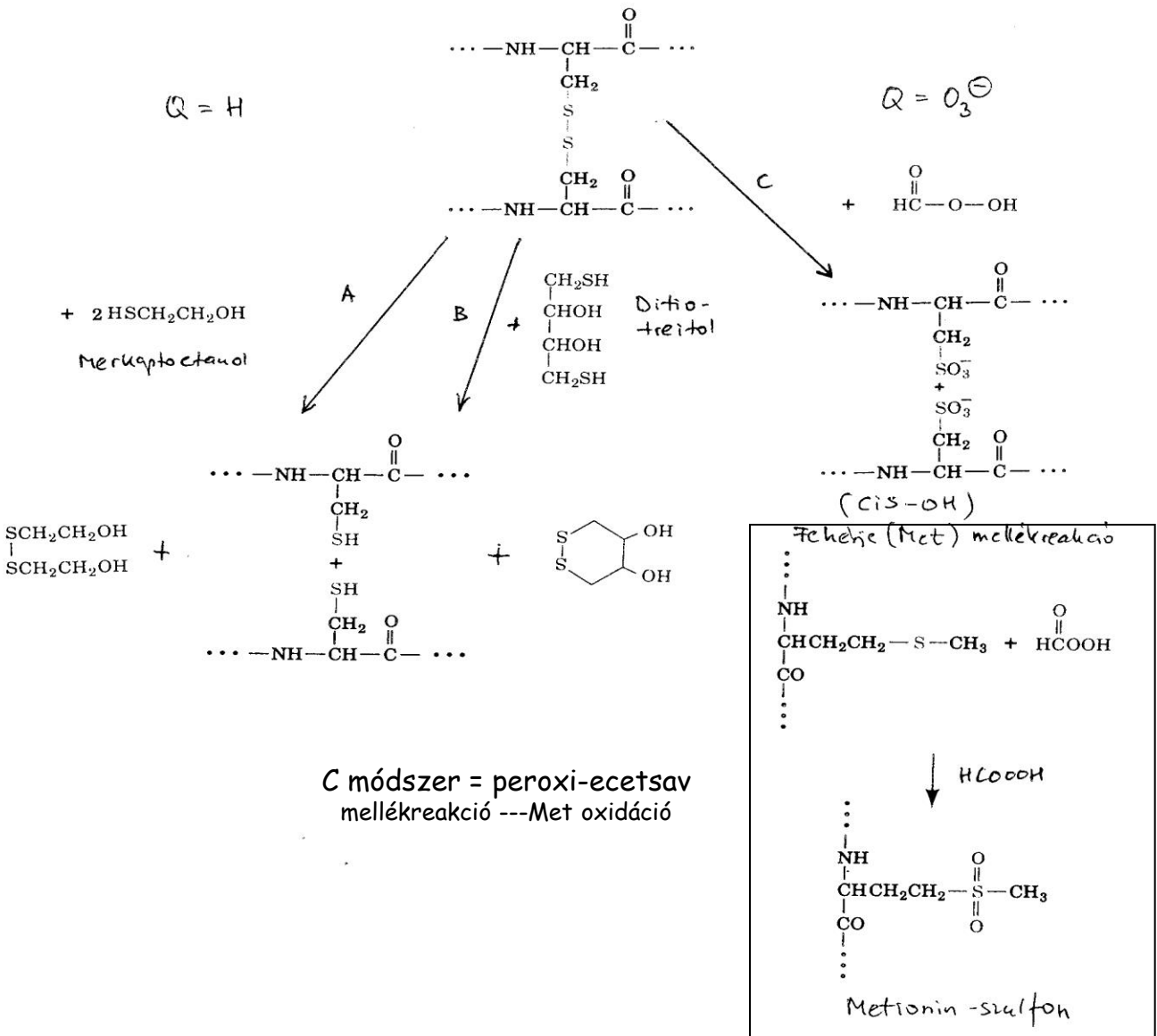
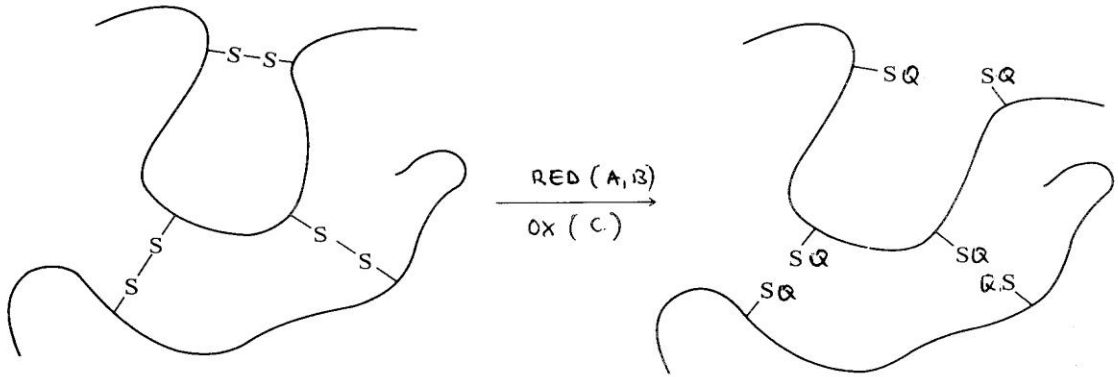
$\lambda = 595 \text{ nm}$

R250: $\text{R}=\text{H}$ \rightarrow COOMASSIE
G250: $\text{R}=\text{CH}_3$ BRILLANT BLUE

(Arg, Lys, His)

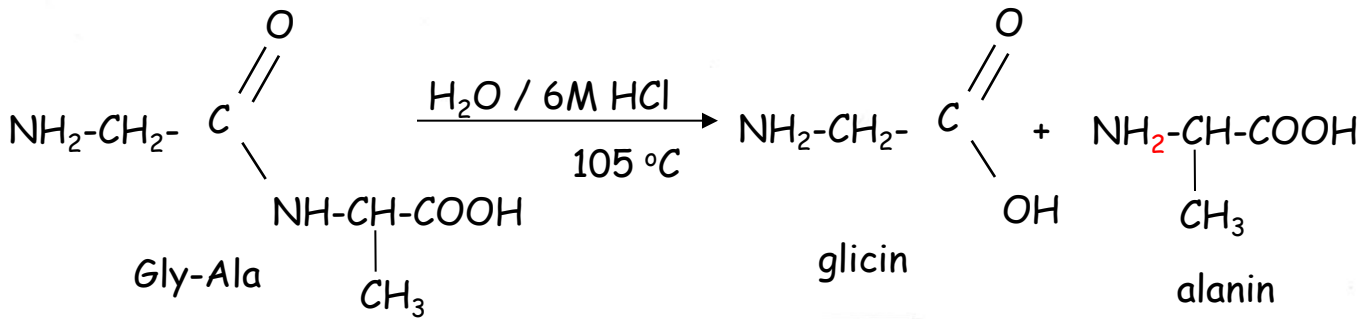
3. Primer szerkezet

3.1. Diszulfid-híd felbontása

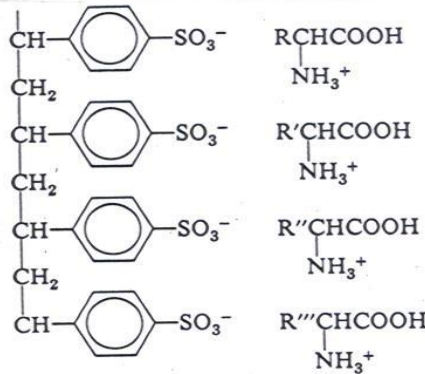


3.1. Aminosav összetétel meghatározása

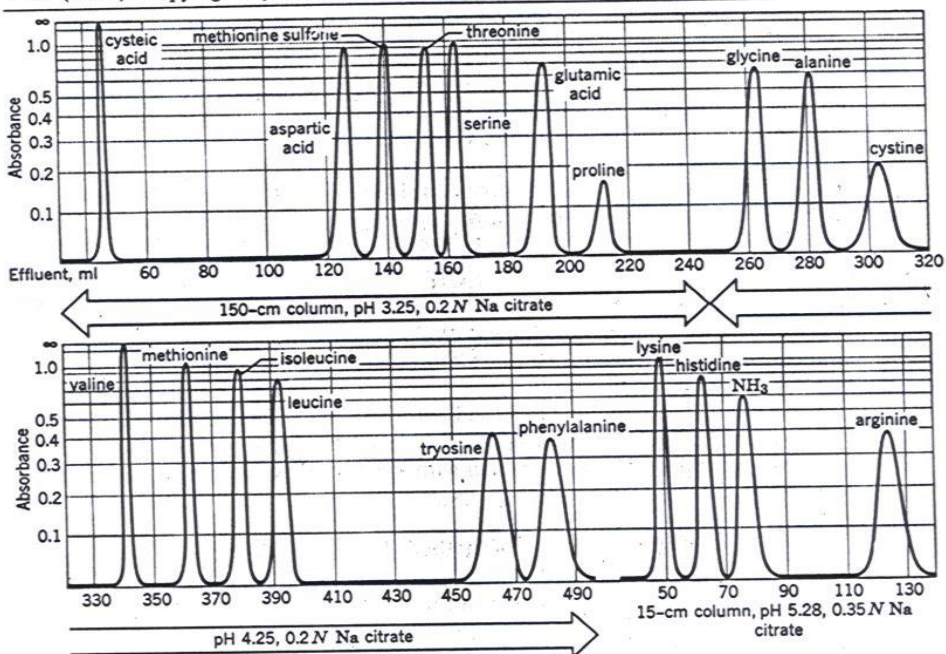
3.1.1. Hidrolízis



3.1.2. Elválasztás, származékképzés



Typical result given by an automatic amino acid analyzer. [Reprinted with permission from D. H. Spackman, W. H. Stein, and S. Moore, Anal. Chem. 30, 1190 (1958). Copyright by the American Chemical Society.]

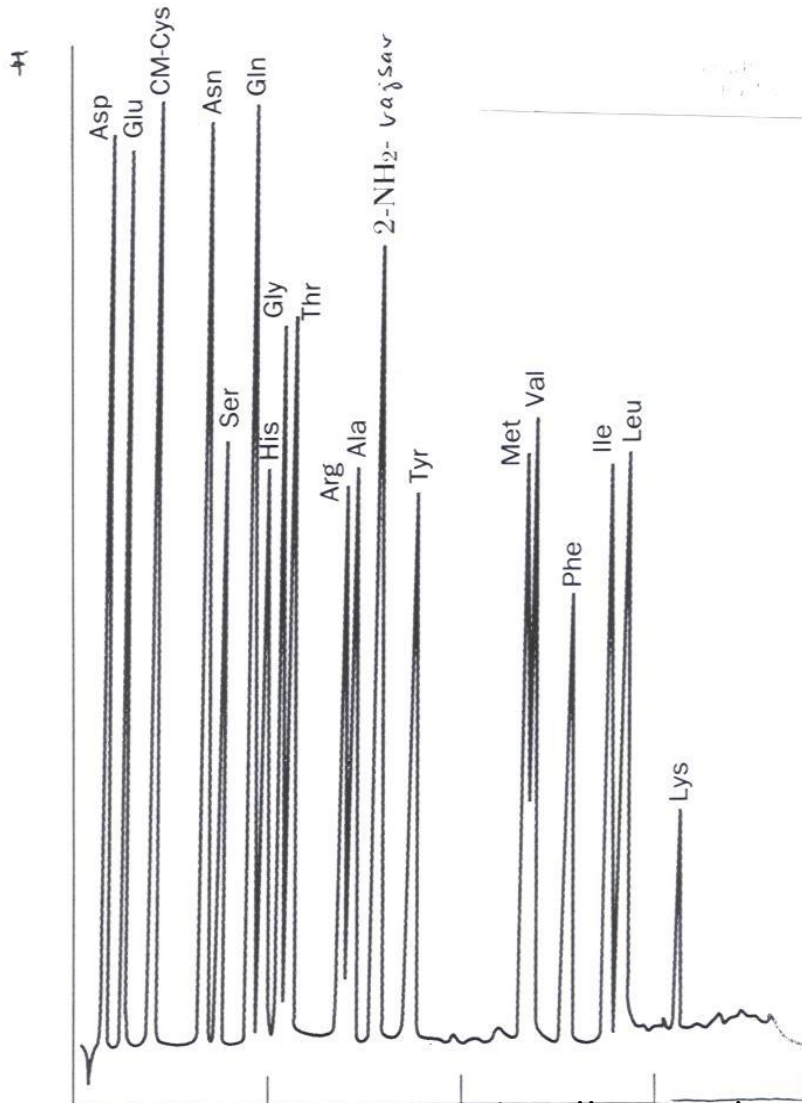
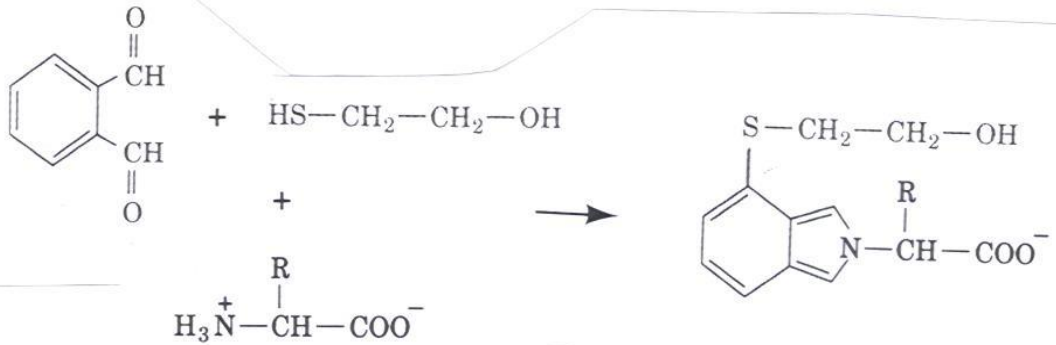


Ioncsérés (oszlop)kromatográfia, Rockefeller Intézet, 1950
 Gyanta: vízben nem oldódó polimer SO₃⁻ csoportokkal
 Detektálás: ninhidrin reakció , λ = 570 nm

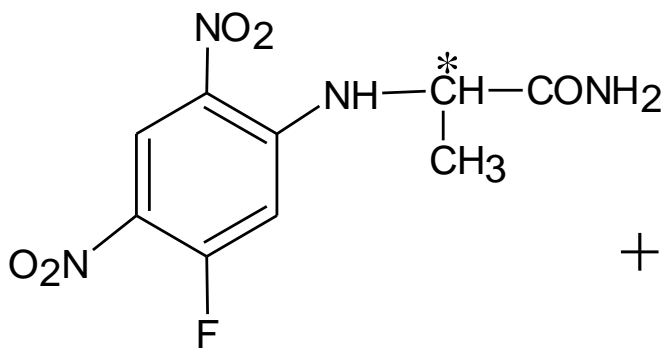
3.1.3. Származékképzés és elválasztás

Származékképzés: o-ftálaldehid

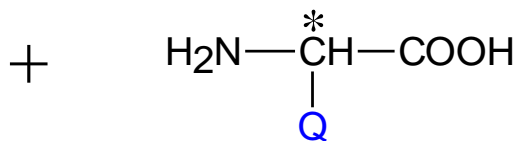
Elválasztás: HPLC, Detektálás: $\lambda_g = 360 \text{ nm}$ $\lambda_e = 455 \text{ nm}$



3.1.4. Származékképzés D/L-aminosav meghatározására

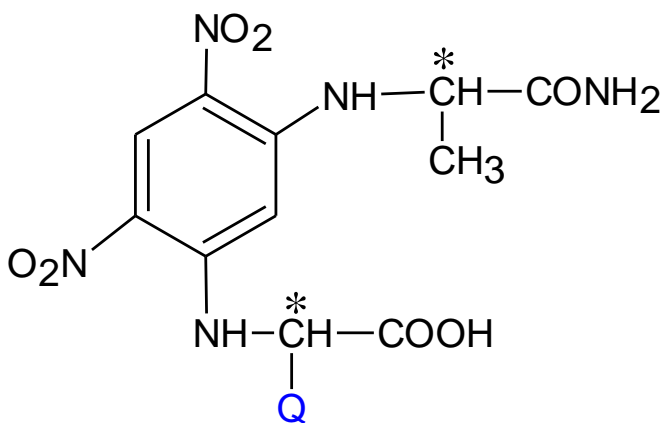


1-fluor-2,4-dinitrofenil-
5-L-Ala-amid
(FDAA)

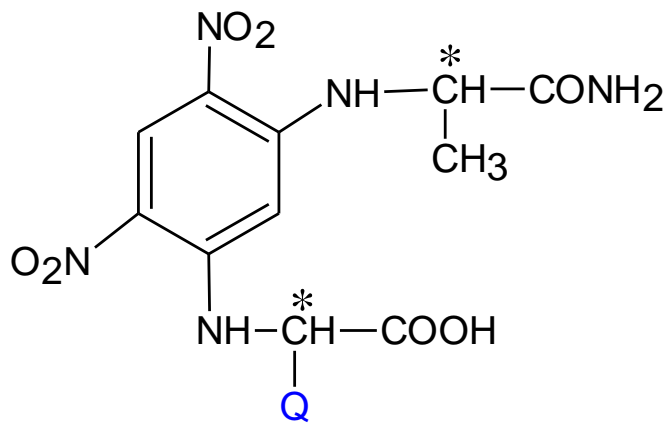


(D,L)

pH 9,0; 10 perc



D,L-származék



L,L-származék

HPLC elválasztás

3. 2. Aminosav sorrend meghatározása

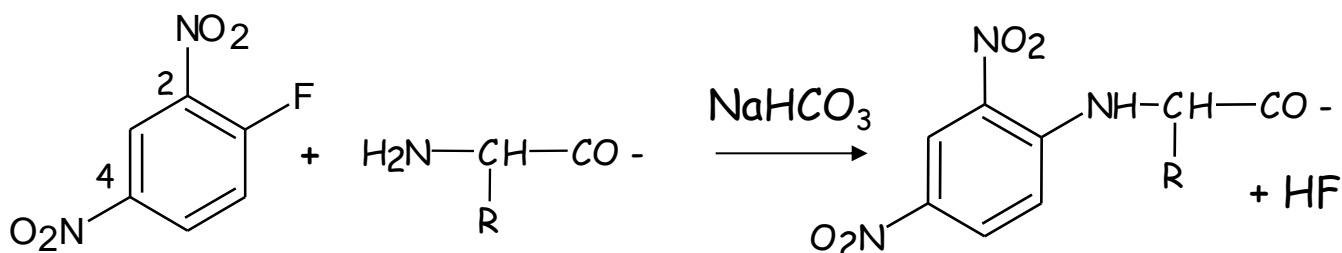
3.2.1. N-terminális

3.2.1.1. Sanger reakció,

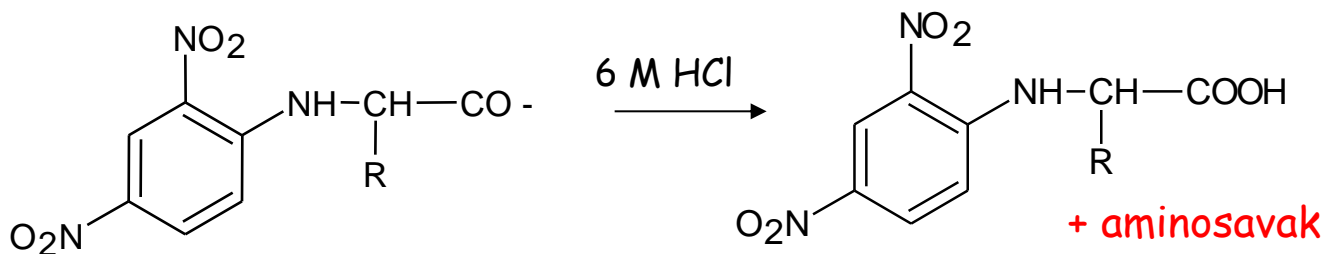
Nobel díj,
1958 (inzulin) és
1980 (oligonukleotid szekvenálás
F. Sanger, P. Berg, W. Gilbert)



F. Sanger (1918-)



1-fluor-2,4-dinitro benzol



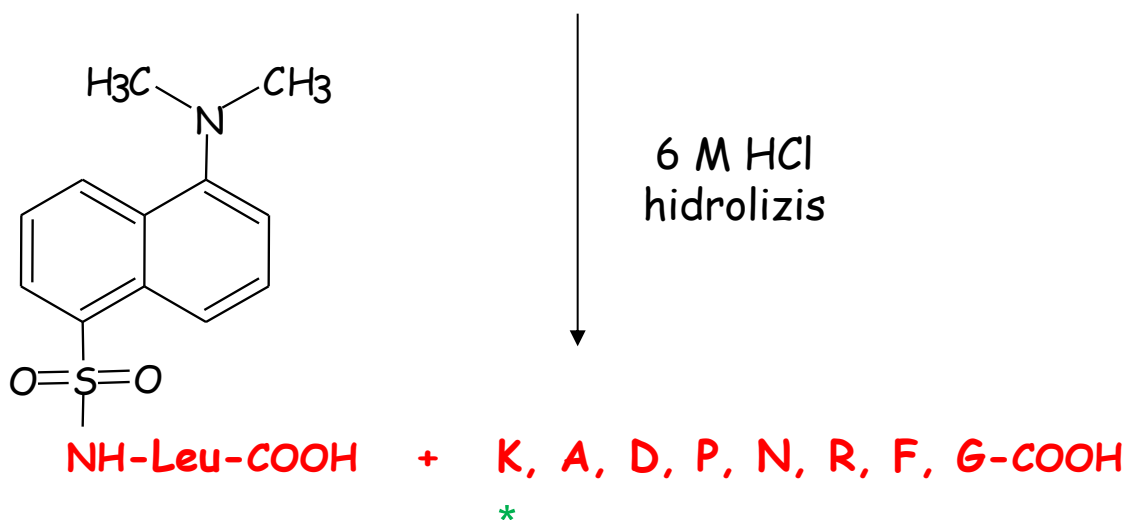
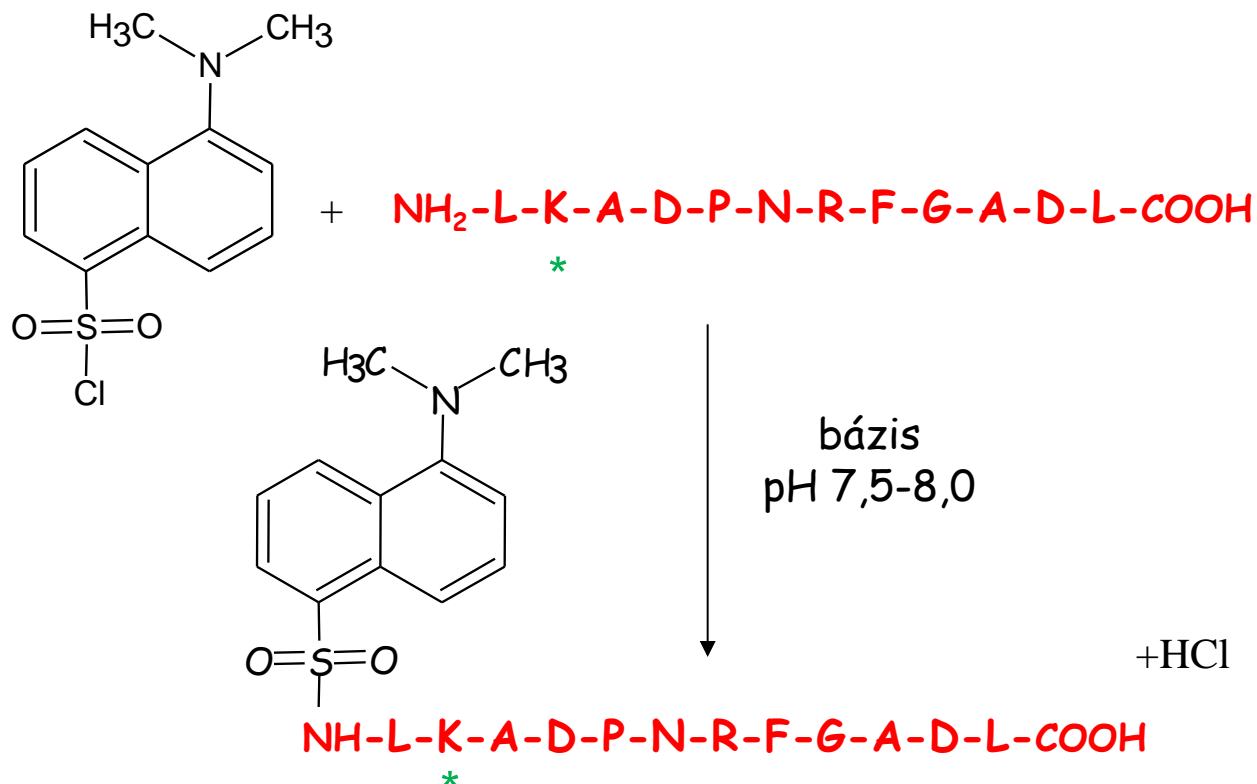
2,4-dinitrofenil fehérje

2,4-dinitrofenil aminosav

$\lambda=254 \text{ nm}$

Mellékreakció: Lys ϵ -aminocsoportja

3.2.1.2. 1-dimetilamino-naftalin-5-szulfonil klorid (Dansyl-klorid, Hartley, 1963)



(Dansyl-aminosav)

$\lambda_g = 360 \text{ nm}$

$\lambda_e = 480 \text{ nm}$

* **Mellékreakció:** Lys ϵ -aminocsoportja

3.2.2. C-terminális



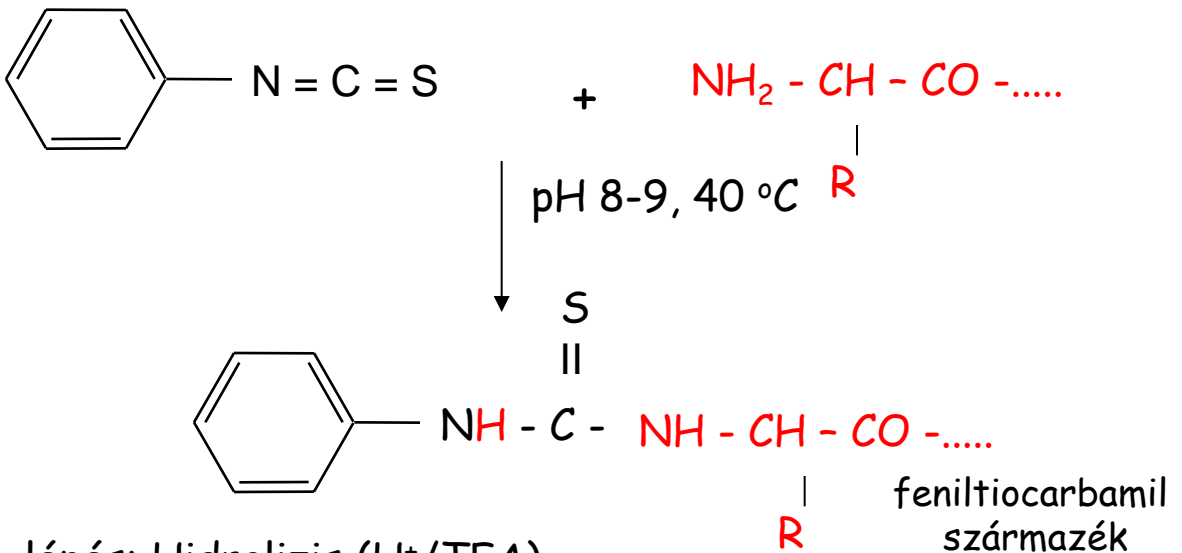
90° C
20 -100 óra



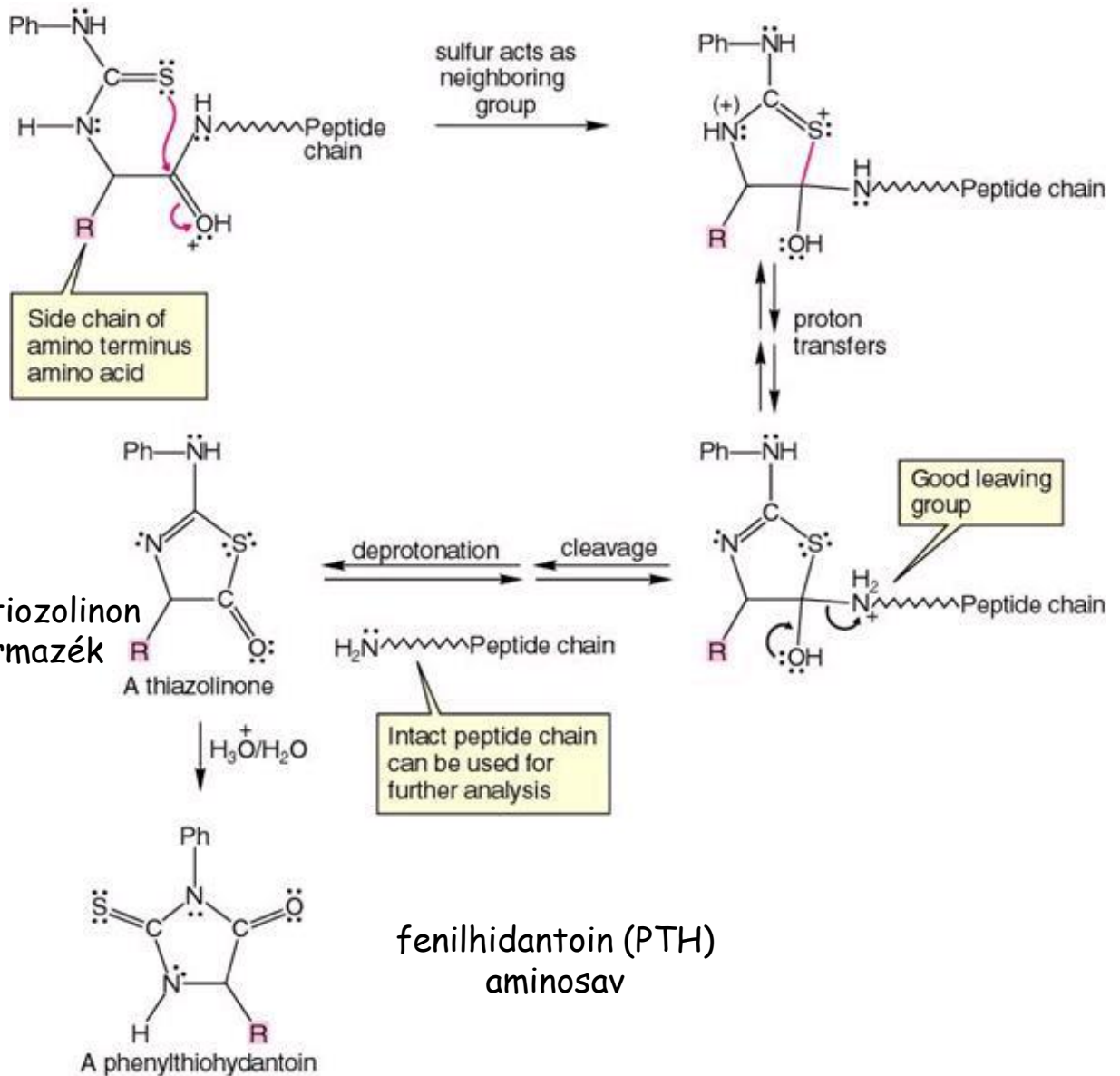
3.2.3. Edman lebontás (P. Edman, Lund, 1950)

1. lépés: Reakció fenilizotiocianáttal (addíció)
2. lépés: Hidrolízis
3. lépés: A feniltiohidantoin származék azonosítása

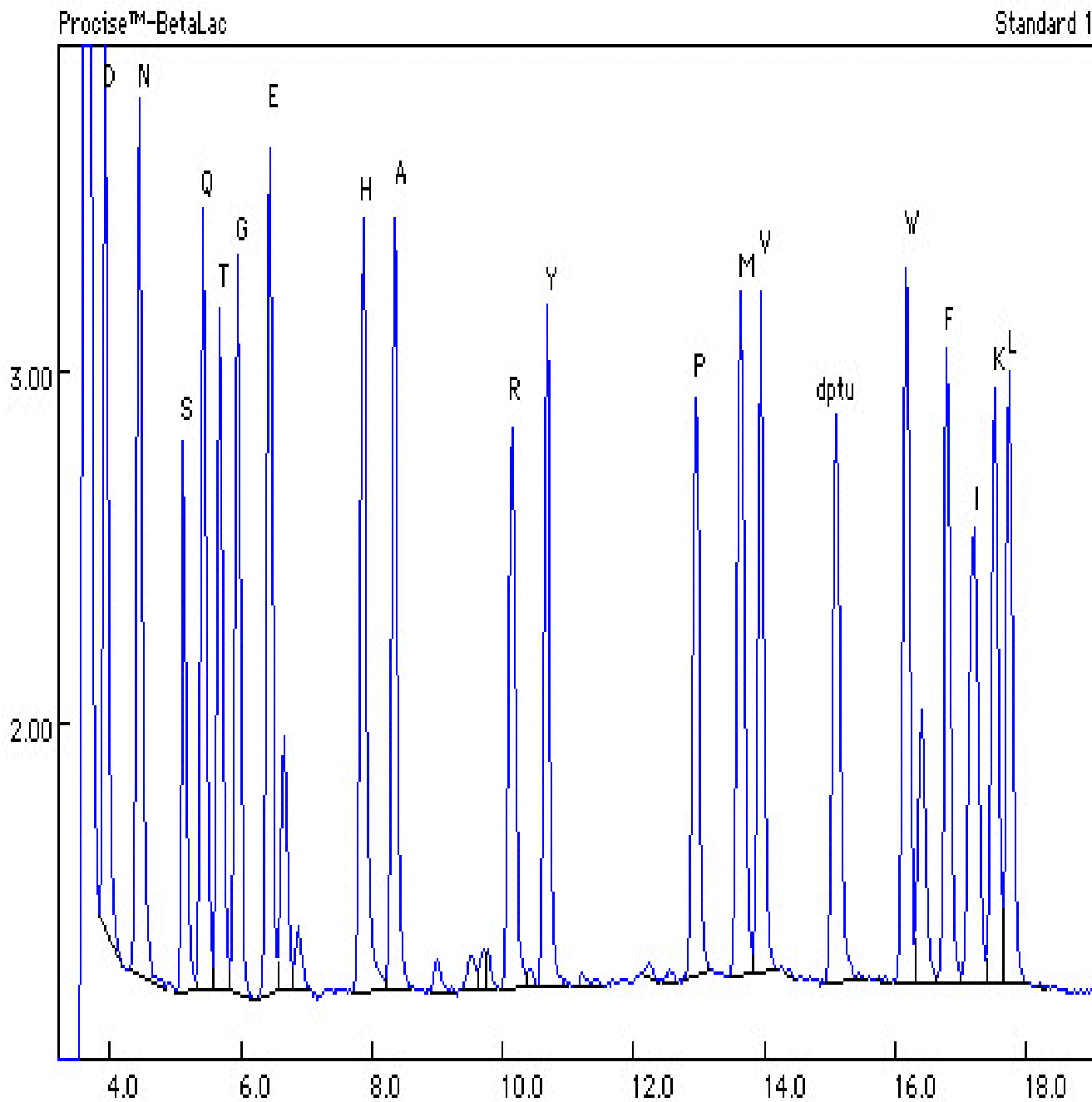
1. lépés: Reakció fenilizotiocianáttal



2. lépés: Hidrolizis (H⁺/TFA)



3. lépés: A feniltiohidantoin származék azonosítása

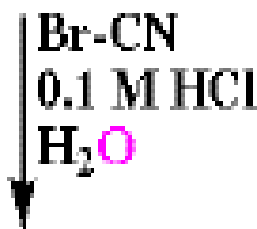
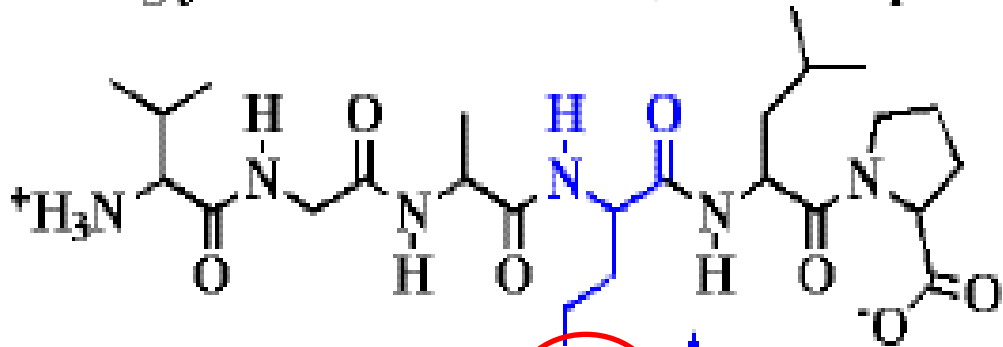


3. 2.4. Fehérjék feldarabolása

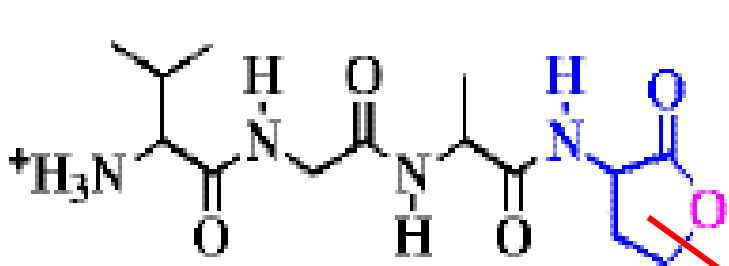
3.2.4.1. Kémiai hasítás

a) Reakció brómczánnal (BrCN), **Met -**

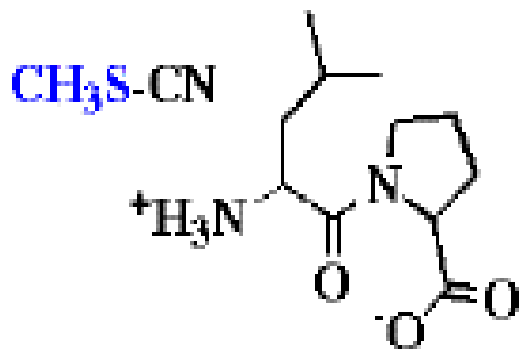
valine-glycine-alanine-methionine-leucine-proline



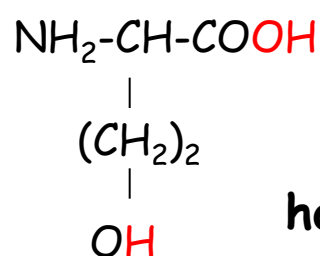
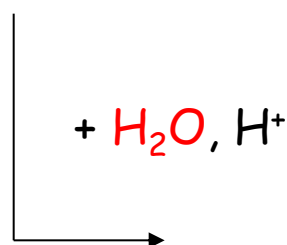
cleavage occurs here



valine-glycine-alanine-lactone



leucine-proline



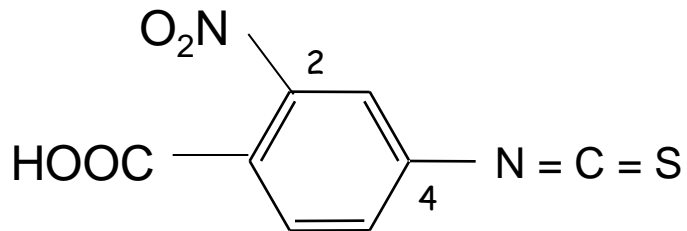
homoszerin

b) Reakció hidroxilaminnal (NH₂ - OH)

Asp - Gly

c) Reakció 2-nitro-4-tiociano - benzooesav

- Cys



3. 2.4.2. Enzimatiskus hasítás

Terminológia (Schechter, Berger)

-S₄ - S₃ - S₂ - S₁ - S_{1'} - S_{2'} - S_{3'} - S_{4'} - enzim

- P₄ -P₃ - P₂ - P₁ - P_{1'} - P_{2'} - P_{3'} - P_{4'} - szubsztrát



- P₄ -P₃ - P₂ - P₁ - OH + H- P_{1'} - P_{2'} - P_{3'} - P_{4'} -

Szerin proteázok: tripszin (Arg, Lys) P₁, trombin,
kimotripszin (Tyr, Trp, Phe) P₁,
elasztáz, kallikrein..

Cisztein proteáz: papain, actinidin...

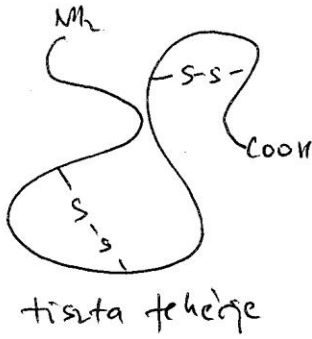
Karboxil proteáz: pepszin, katepszin D (lizoszoma),
LysC (Lys) P₁, GluC (Glu, Asp)...

Aminoproteáz: AspN (Asp)P₁.....

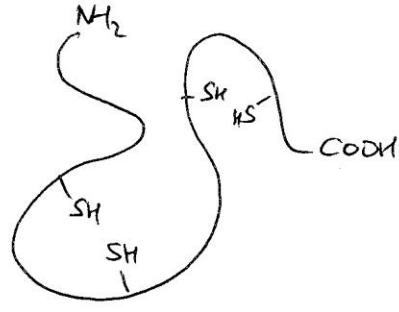
Metalloproteáz: temolizin, karboxipeptidáz A...

Primer szerkezet, aminosavsorrend

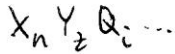
- összegzés



Diszulfid-híd
REDUKCIÓ



AMINOSAV-
ÖSSZETÉTEL
MEGHATÁROZÁS
(HIDROLÍZIS)

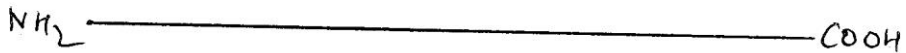


VÉGCSOPORT
MEGHATÁROZÁS

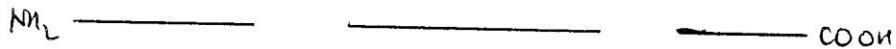
- N-terminális
- C-terminális

AMINOSAVSORREND
MEGHATÁROZÁS

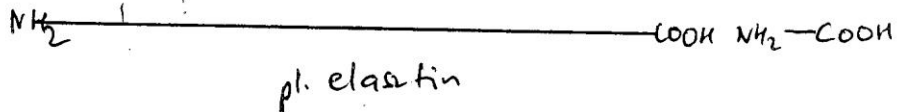
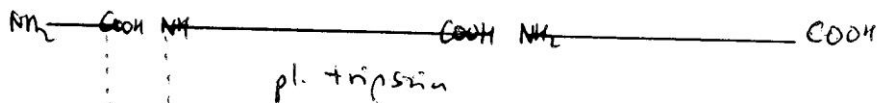
1. EDDAN LEBONTÁS (~60 aminosav)



2. RÉSZLEGES LEBONTÁS (BrCN módszer) MET

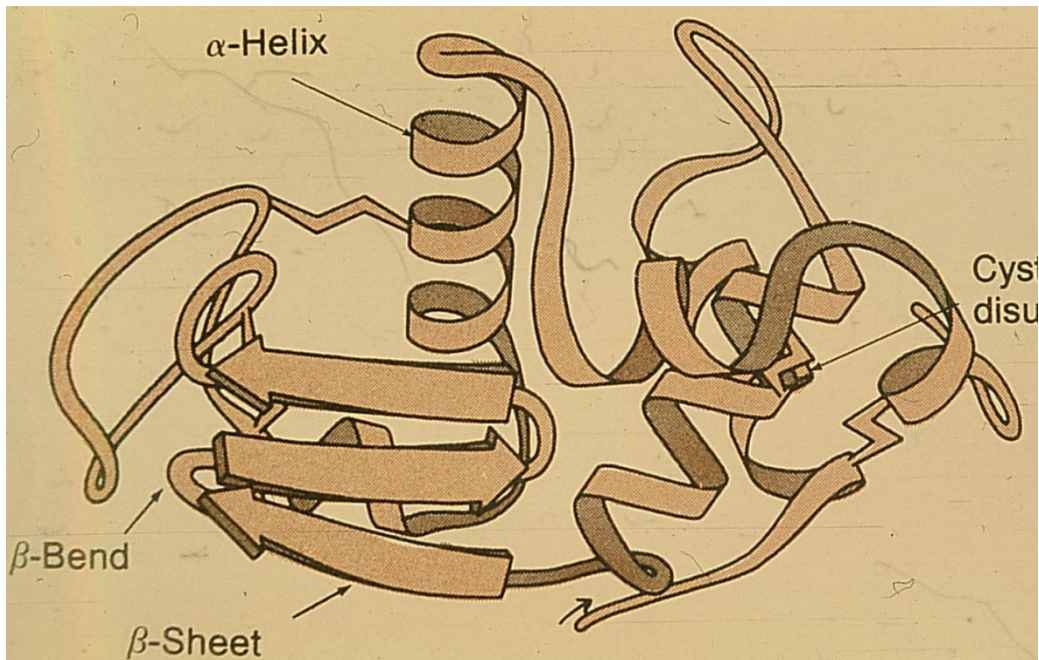
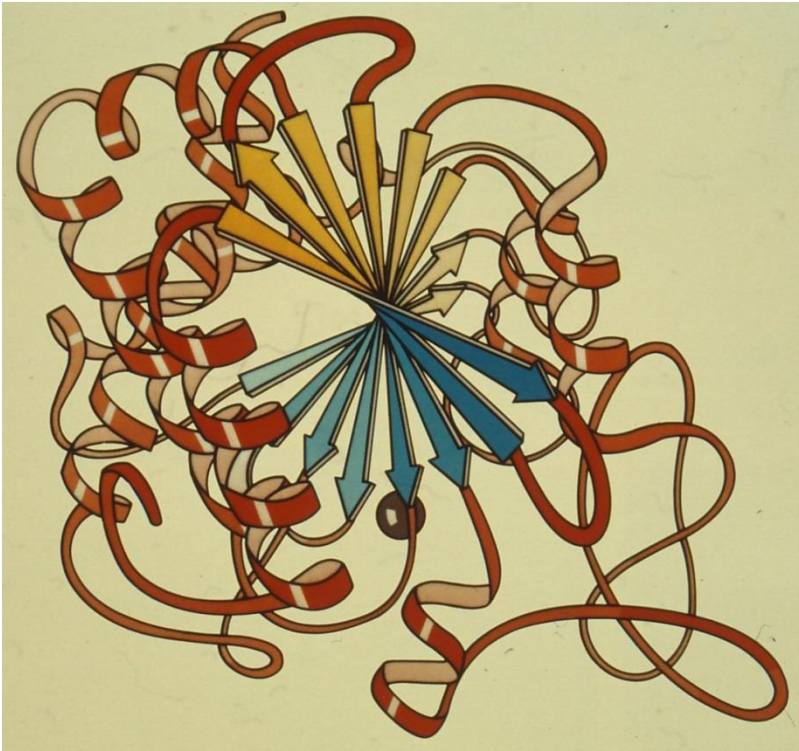


3. RÉSZLEGES LEBONTÁS (enzimikus hidrolízis)



a) elválasztás, b) aminosavsorrend c) átfordított peptidok

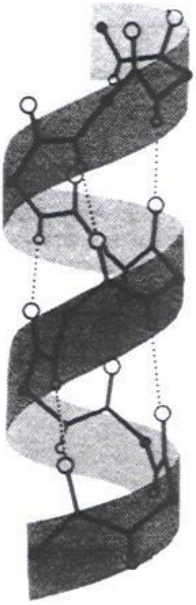
3. Térszerkezet



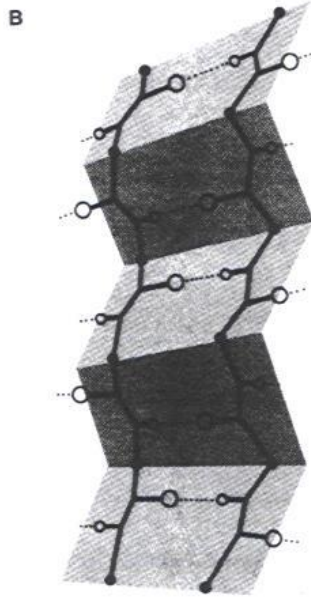
Szerkezeti hierarchia



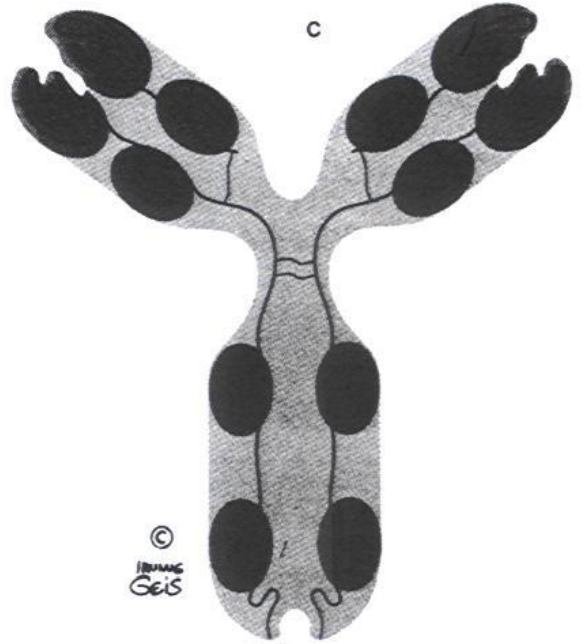
PRIMER SZERVEZET



α helix

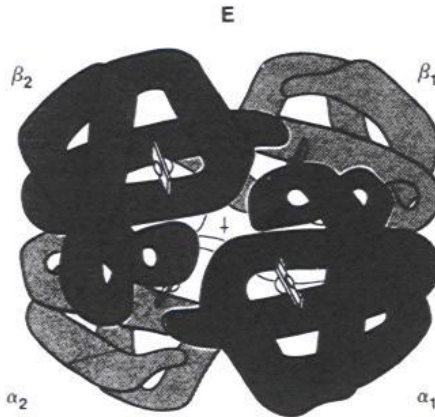


β -RÉTEG

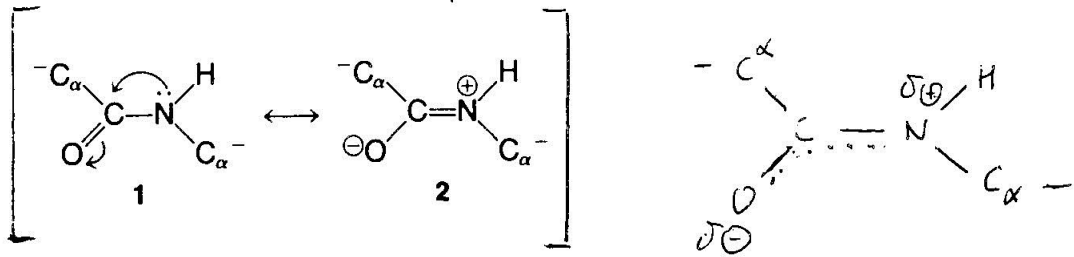


LOKÁLIS
'MÁSODLAGOS'

MÁSODLAGOS
SZERVEZET

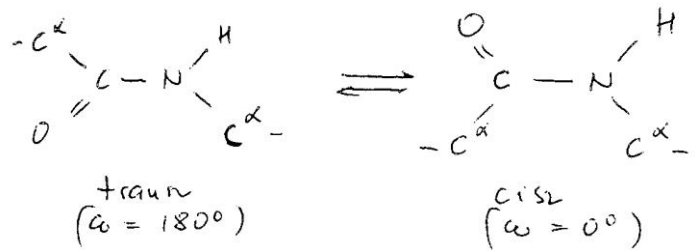
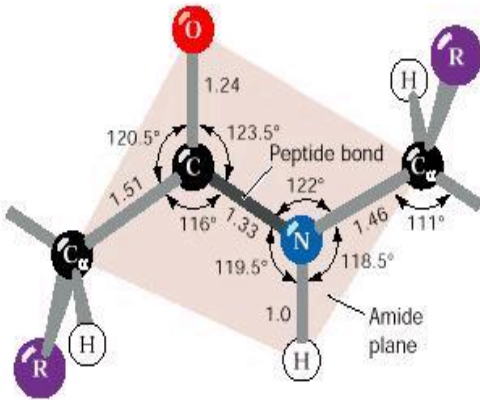
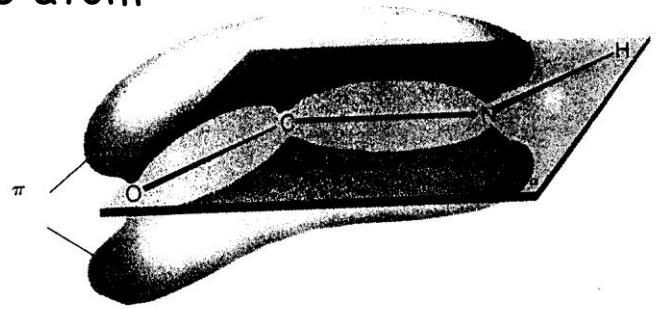


Az amid kötés

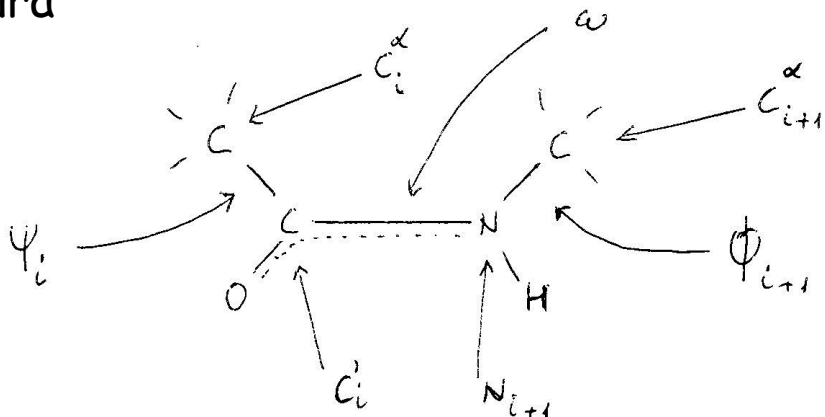


Delokalizáció, 2 elektron, 3 atom

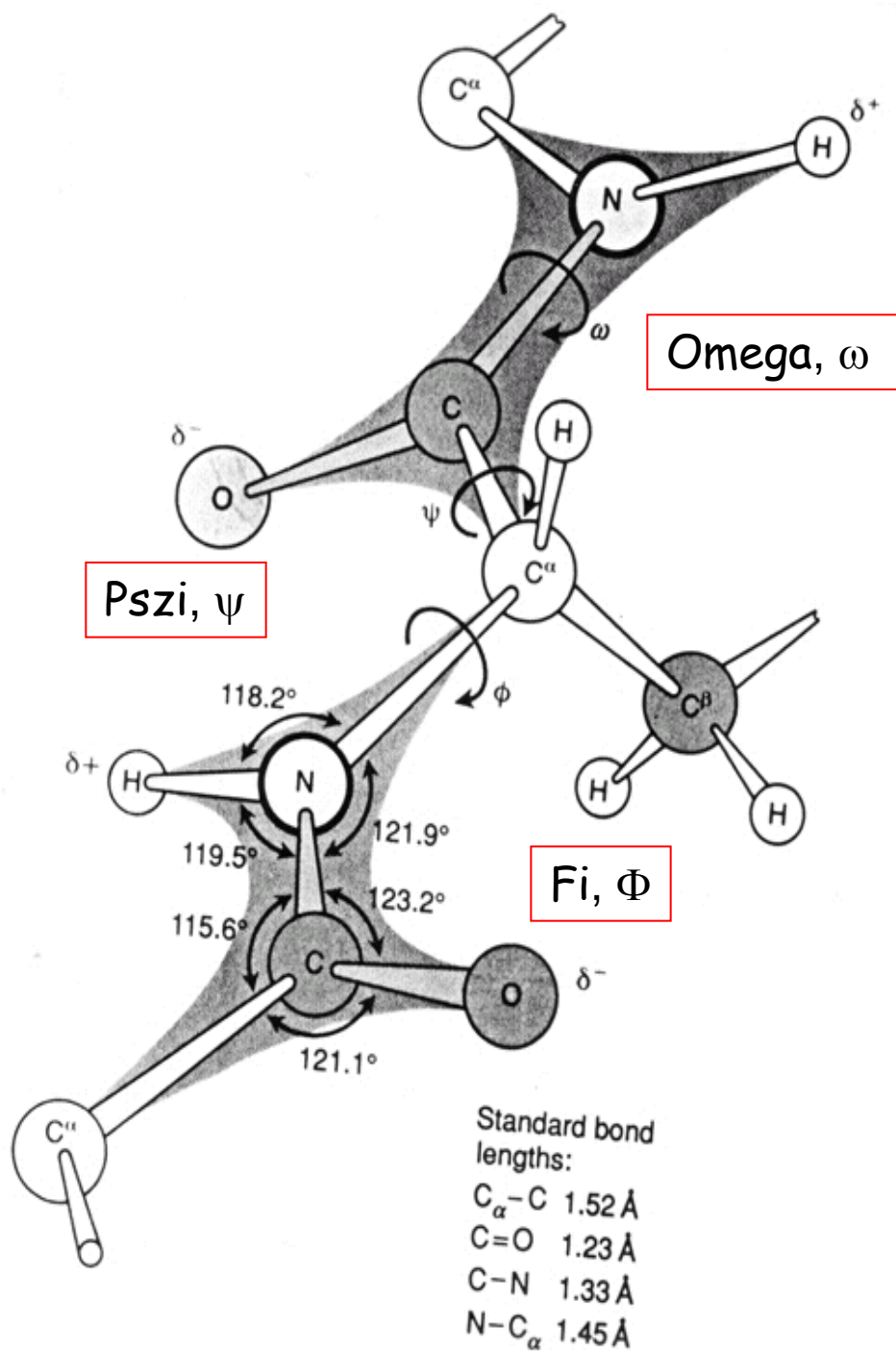
- Gyenge N bázis
- Erős H-híd
- Részleges kettős kötés
- Síkalkat
- Cisz/transz izoméria



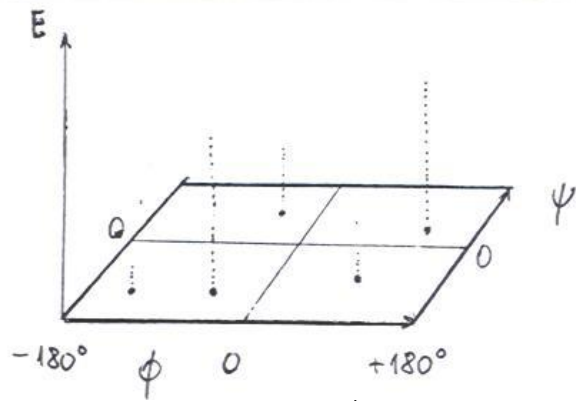
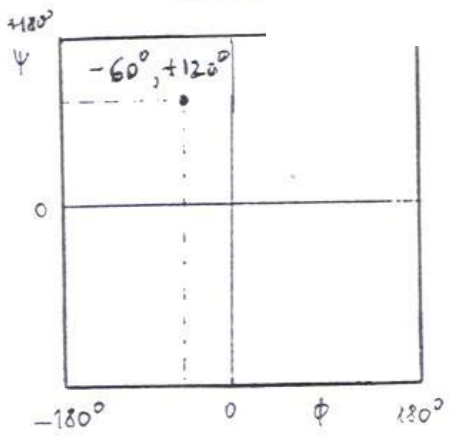
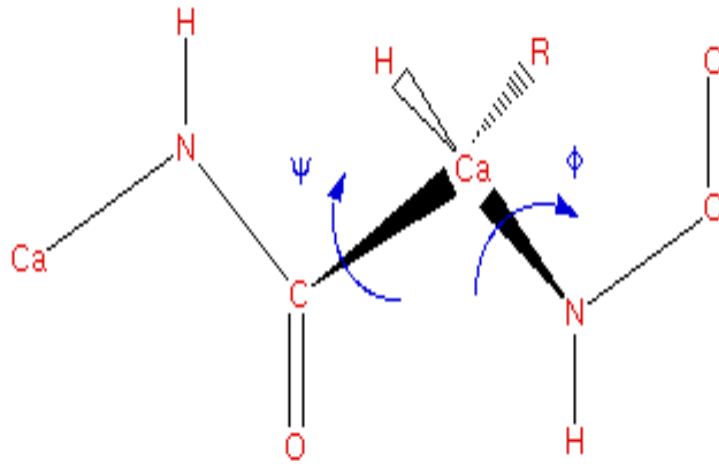
Nomenklatúra



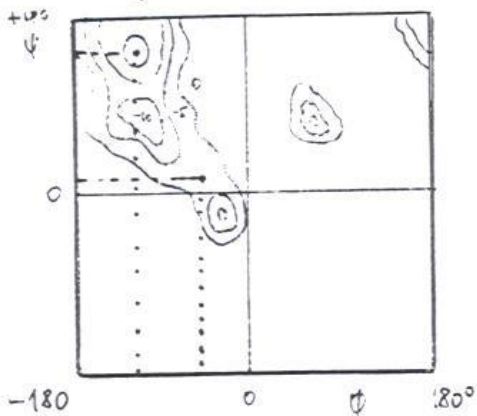
A Ramachandran térkép - bevezetés



A Ramachandran térkép

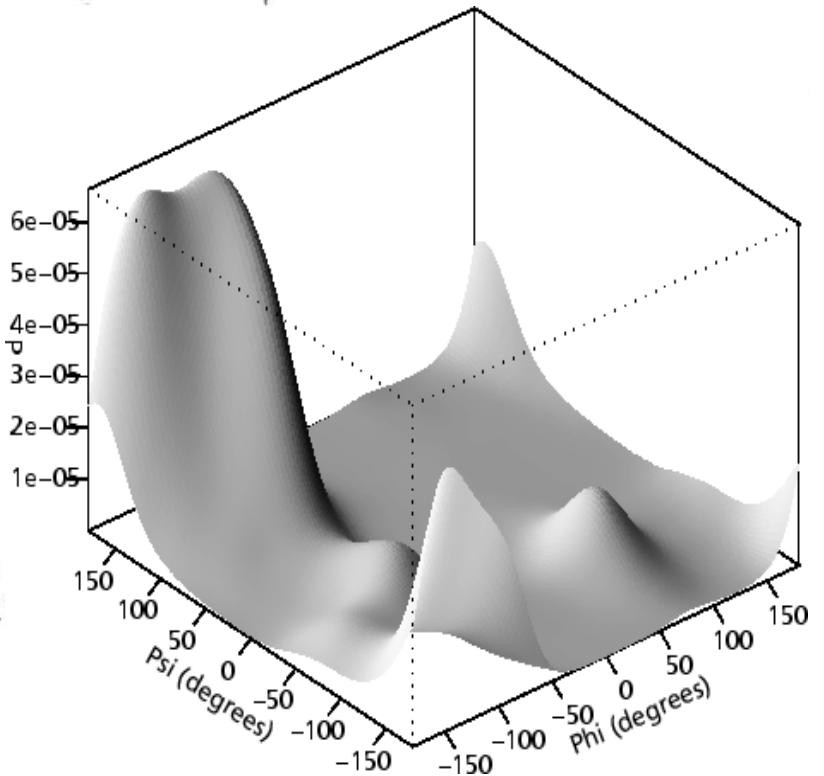


KONFORMÁCIÓS TÉRKÉP
(szintvonalak)

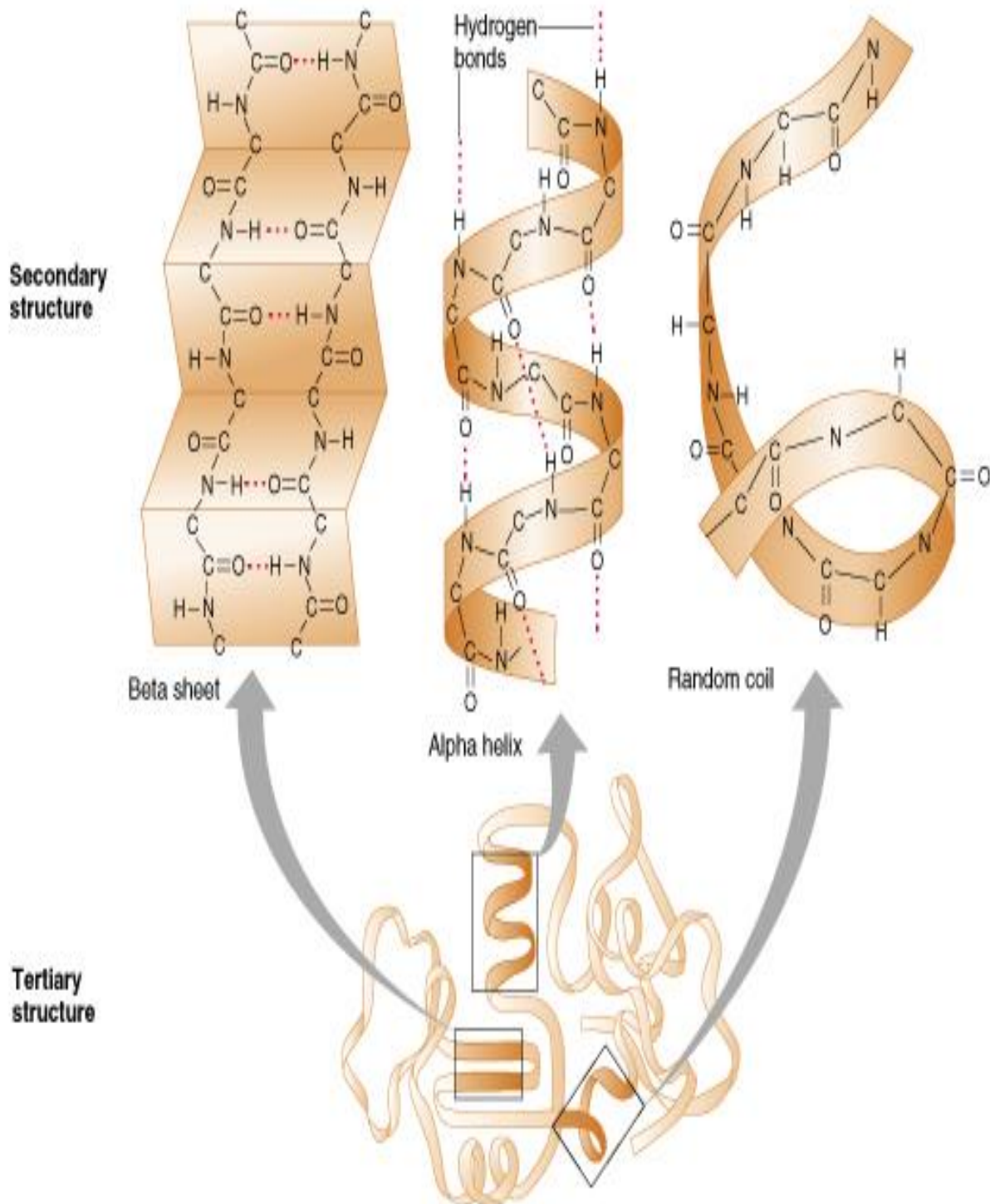


$$\psi = +170^\circ, \phi = 120^\circ \quad E = -10,67 \text{ kJ/mol}$$

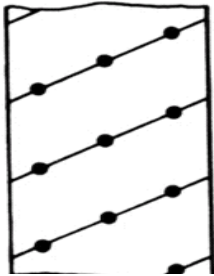
$$\psi = +20^\circ, \phi = -60^\circ \quad E = -2,543 \text{ kJ/mol}$$



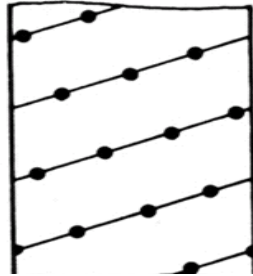
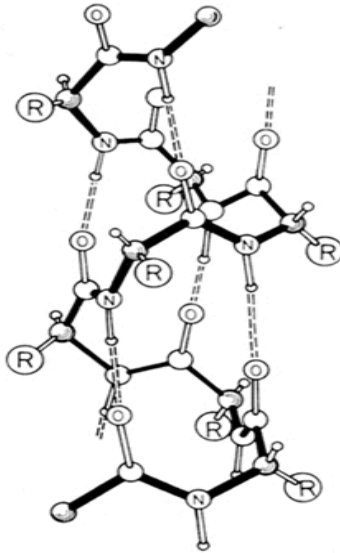
Másodlagos szerkezet típusai



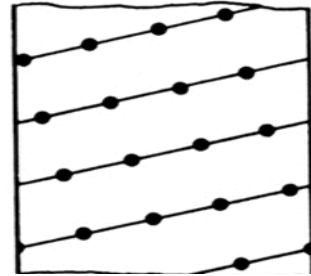
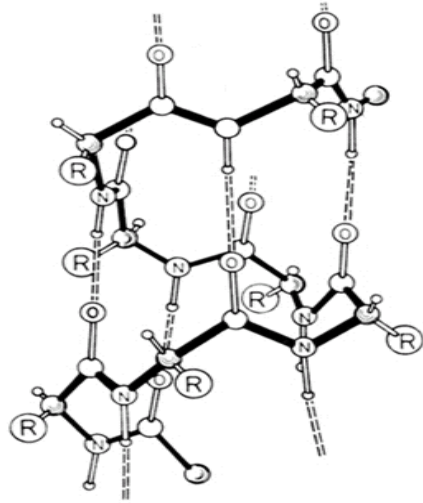
Helikális szerkezet



3_{10} – hélix,

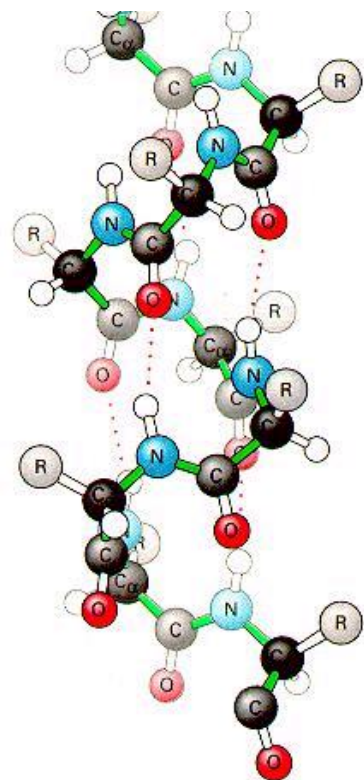
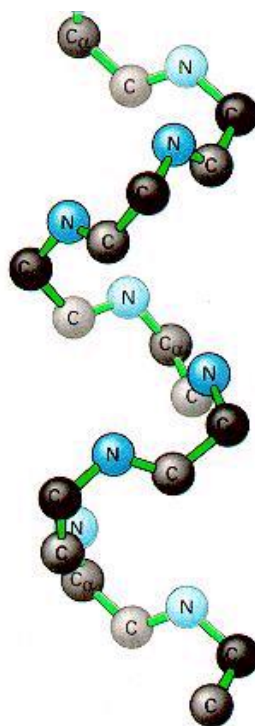
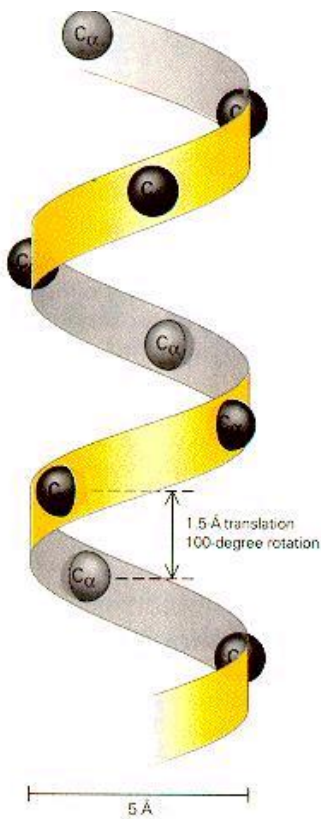


alfa α -hélix,



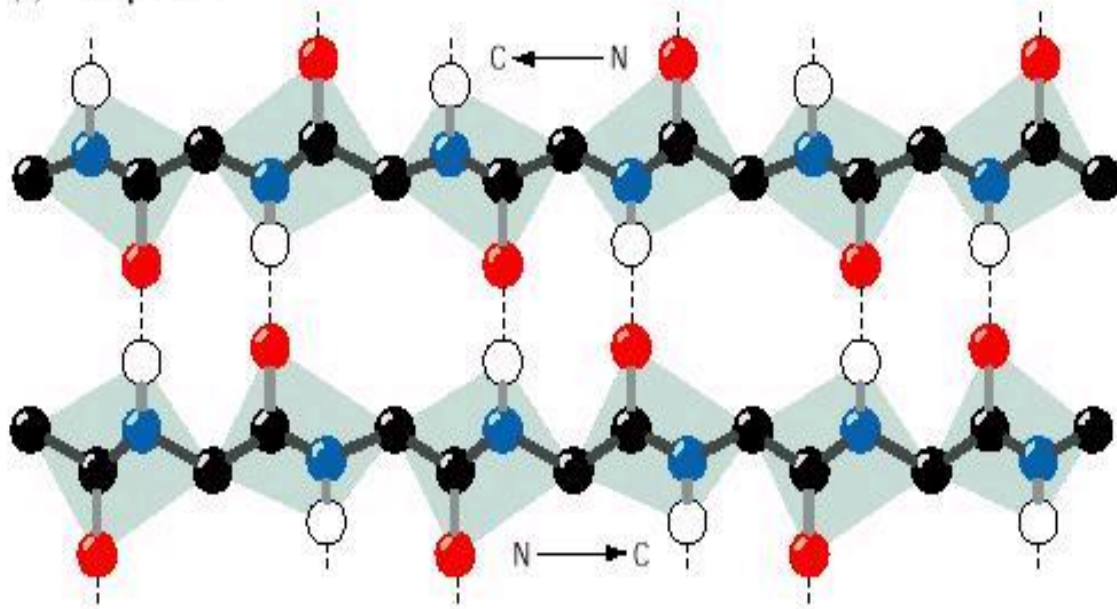
pi π -hélix

10 Å

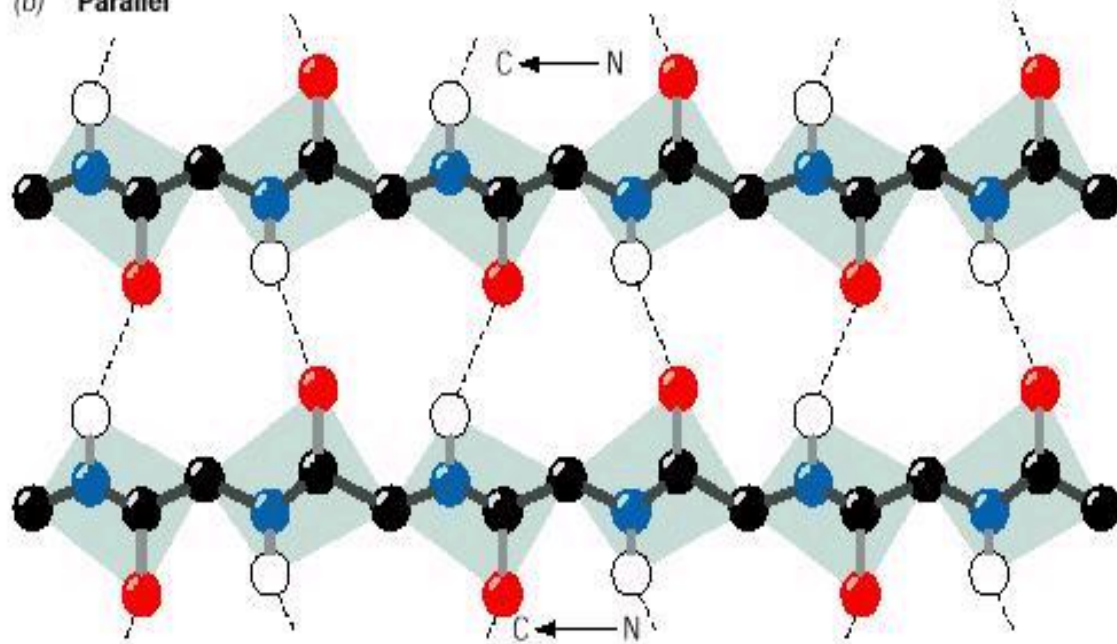


Béta redőzött réteg szerkezete

(a) Antiparallel



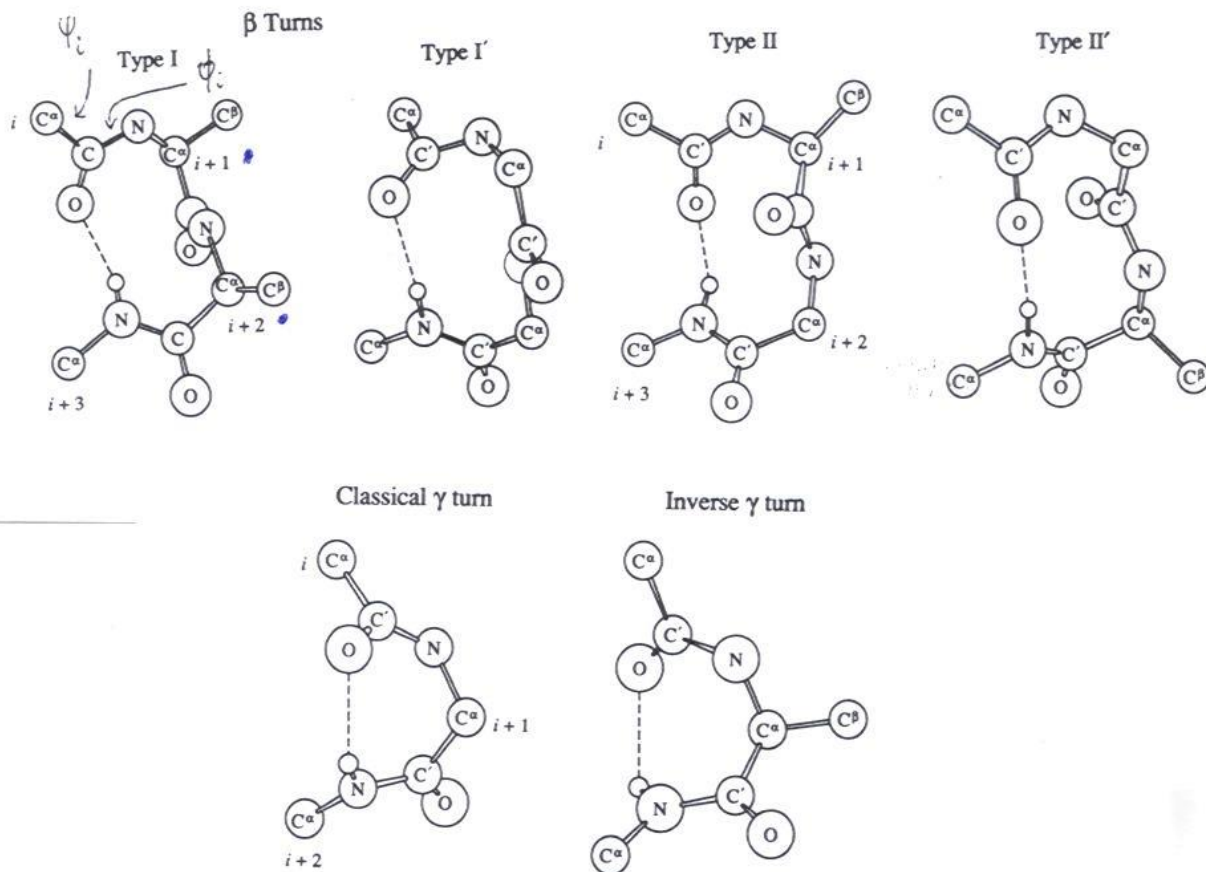
(b) Parallel



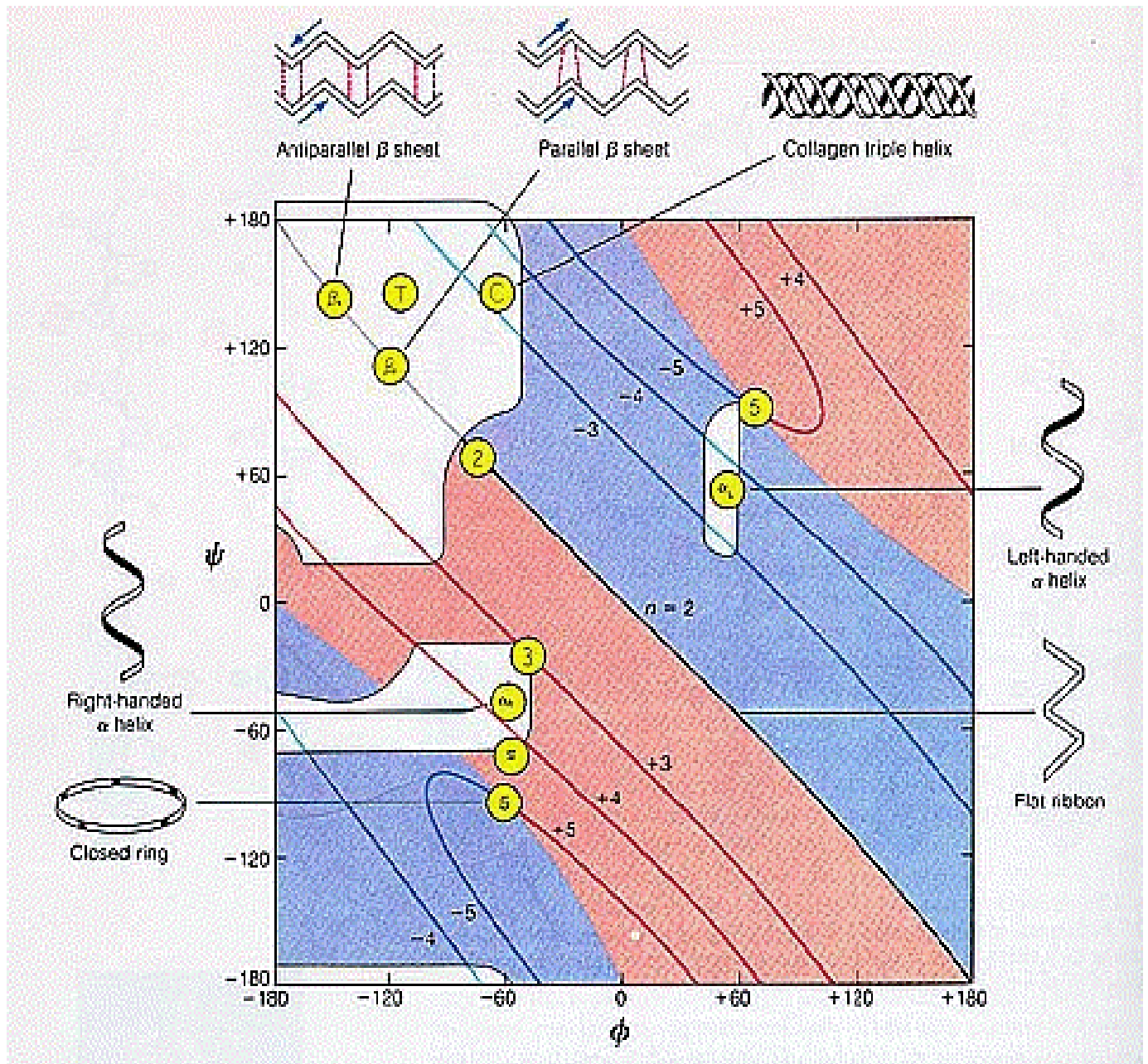
Kanyar szerkezet

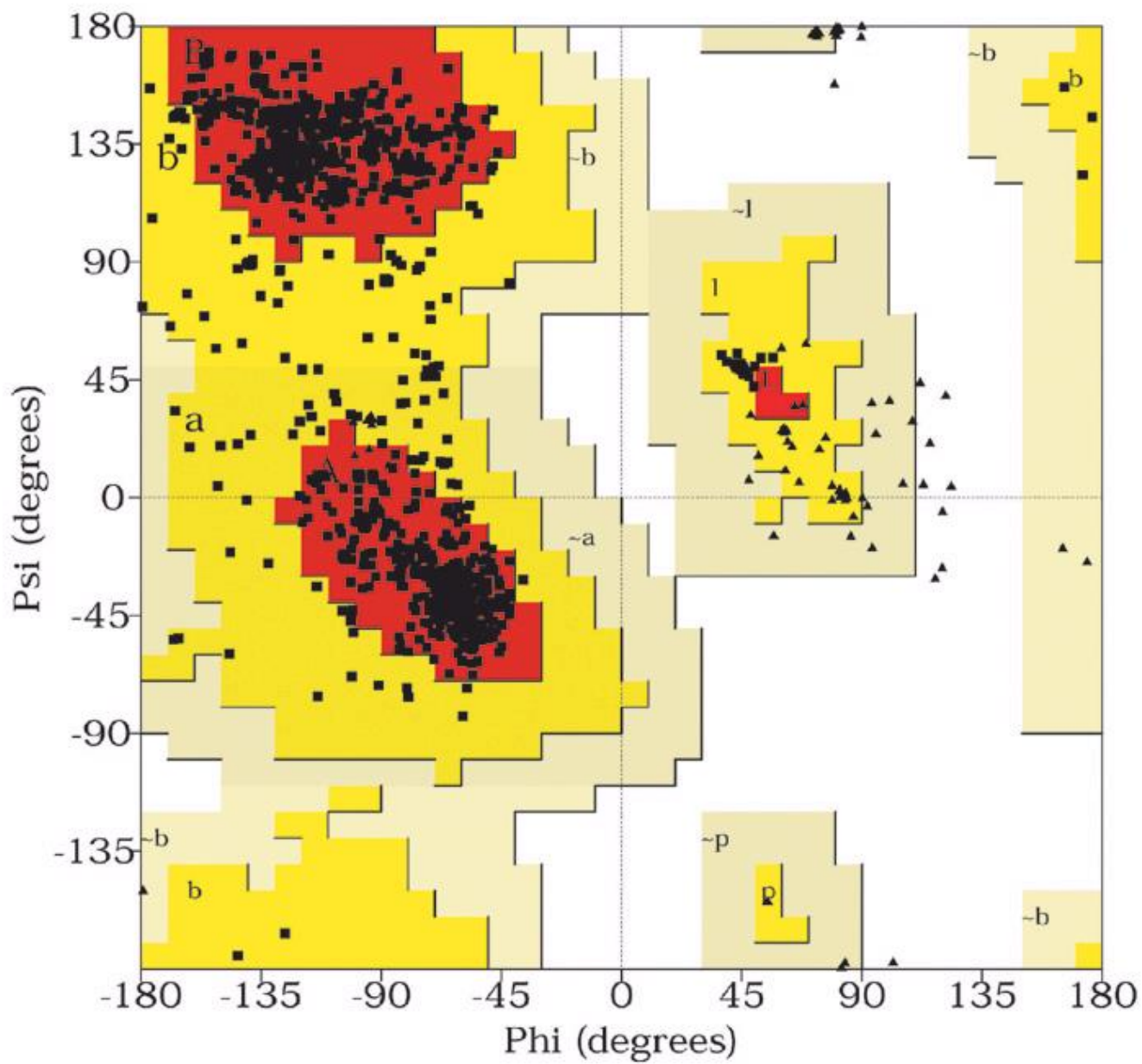
Bend type	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
γ				
classical	70 to 85	-60 to -70		
inverse	-70 to -85	60 to 70		
β				
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0

^a The central residue of a γ turn is numbered $i + 2$; the two central residues of a β turn are $i + 2$ and $i + 3$.



A Ramachandran térkép - összefoglalás





Konformerek energiatartalma

Források : kötéshossz (E_d) - változatlan
vegyértékszög (E_o) - változatlan
torziós szög (E_ω) - változik

Nem kötött atomok távolsága (E_w)

Kötő elektronpárok kölcsönhatása (E_h)

Elektrosztatikus kölcsönhatás

$$\Delta E = \Delta E_d + \Delta E_o + \Delta E_\omega + \Delta E_w + \Delta E_h + \Delta E_e$$

Példa:

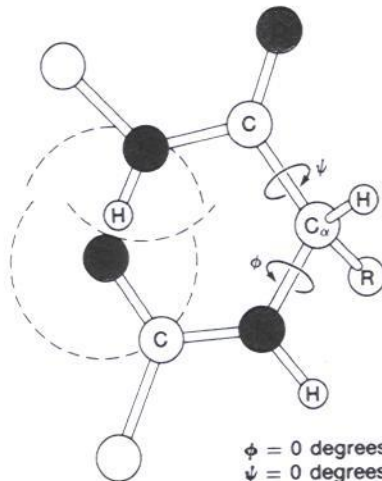
Fehérje 100 aminosavból

a) ha:

10 konformáció/as
lehetséges

akkor:

10^{100} konformer



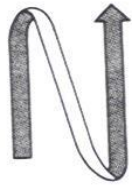
b) ha:

2 konformáció/as
lehetséges

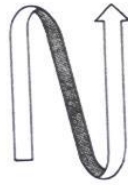
akkor:

10^{30} konformer

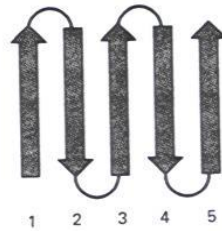
Szupermásodlagos szerkezetek



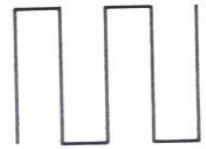
$\beta-\alpha-\beta$



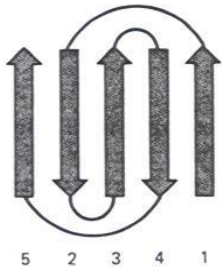
Very rare



1 2 3 4 5



Görög kulcs



5 2 3 4 1



Not observed

Béta kígyó

Csoportosítás

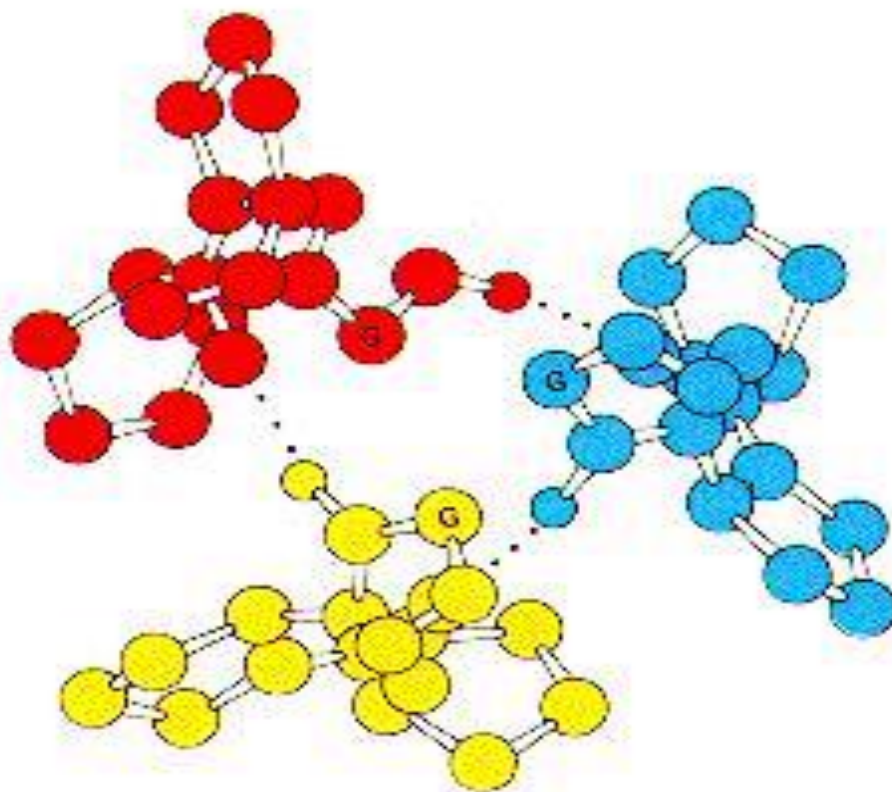
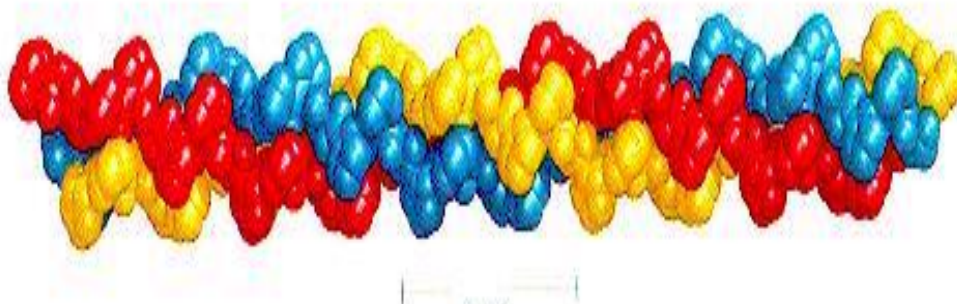
→ Alfa (α) csak alfa hélix

Béta (β) csak béta réteg

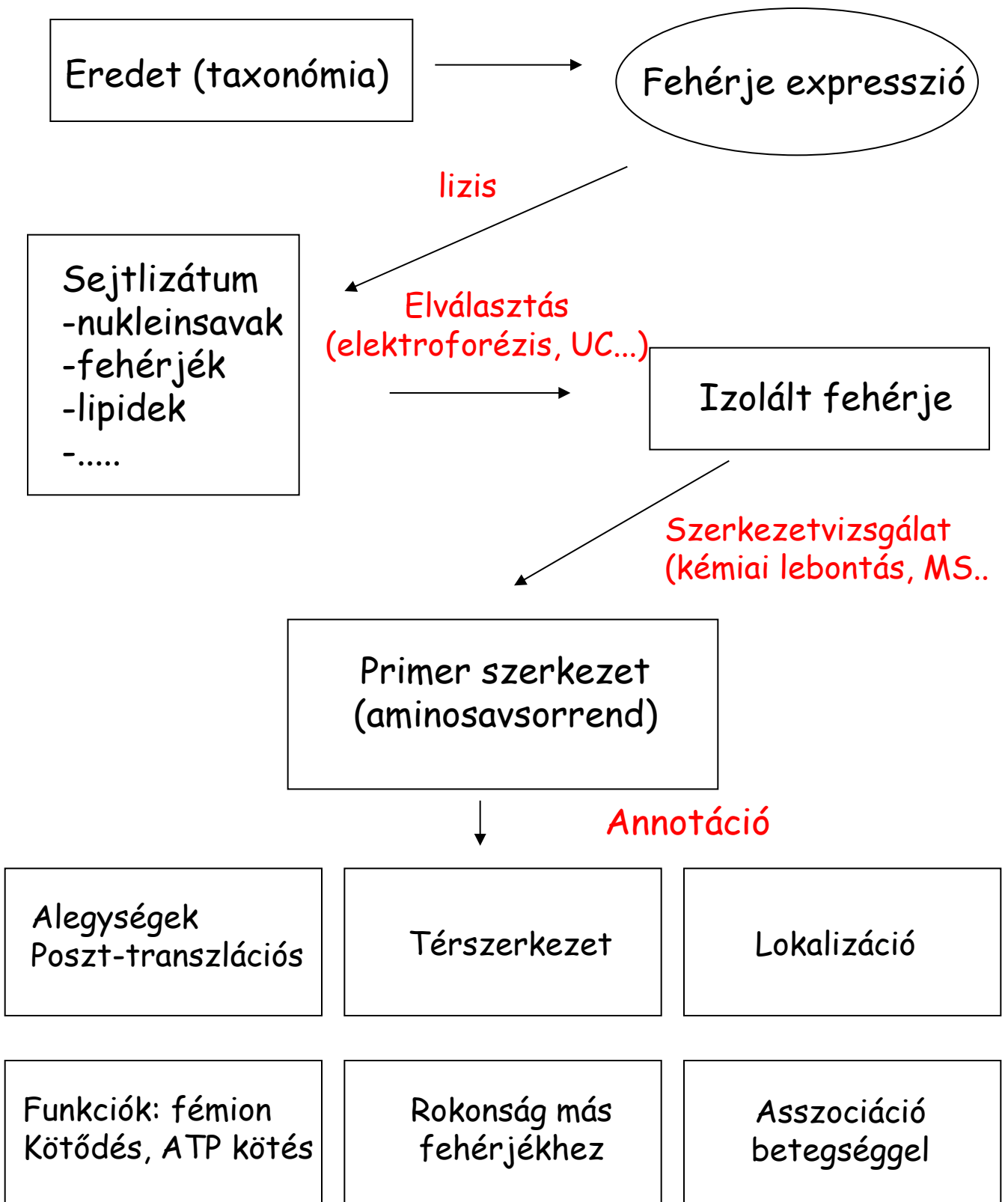
Alfa + béta ($\alpha + \beta$) hélix és réteg egymástól távol

Alfa/béta (α/β) hélix és réteg egymással kölcsönhatásban

Negyedleges szerkezet - a kollagén

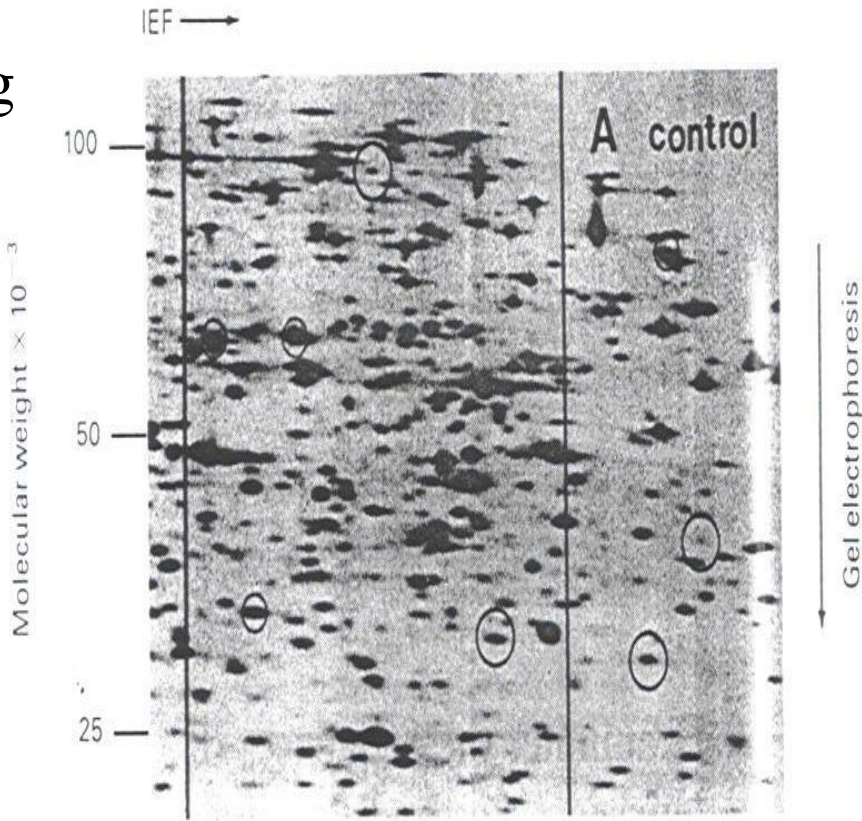


A proteomika alapjai

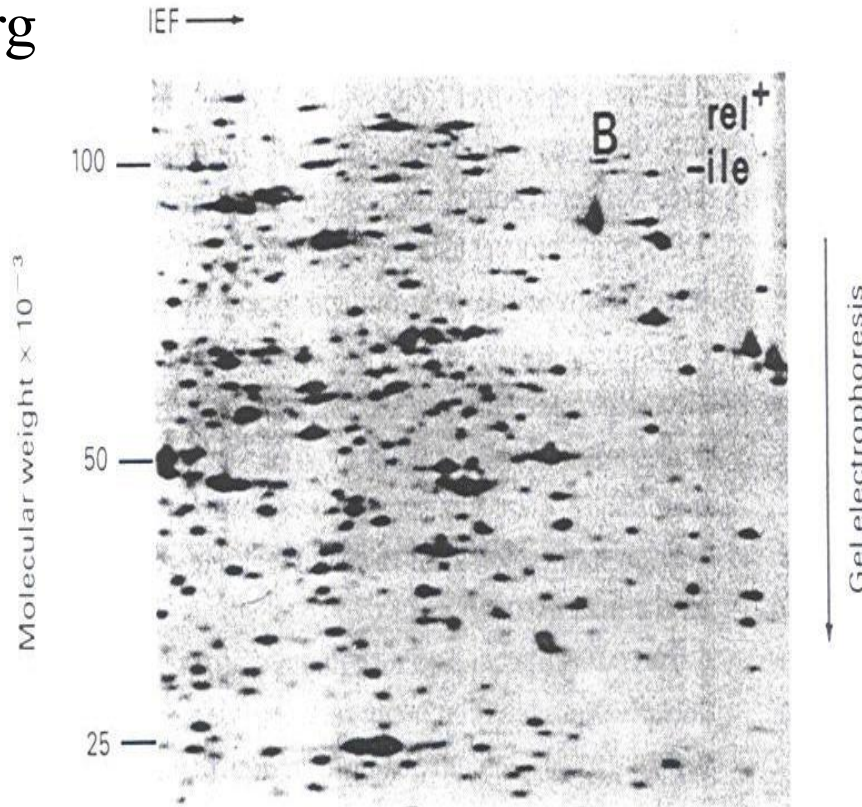


A médium összetételének hatása az E coli fehérje összetételére

Arg



- Arg

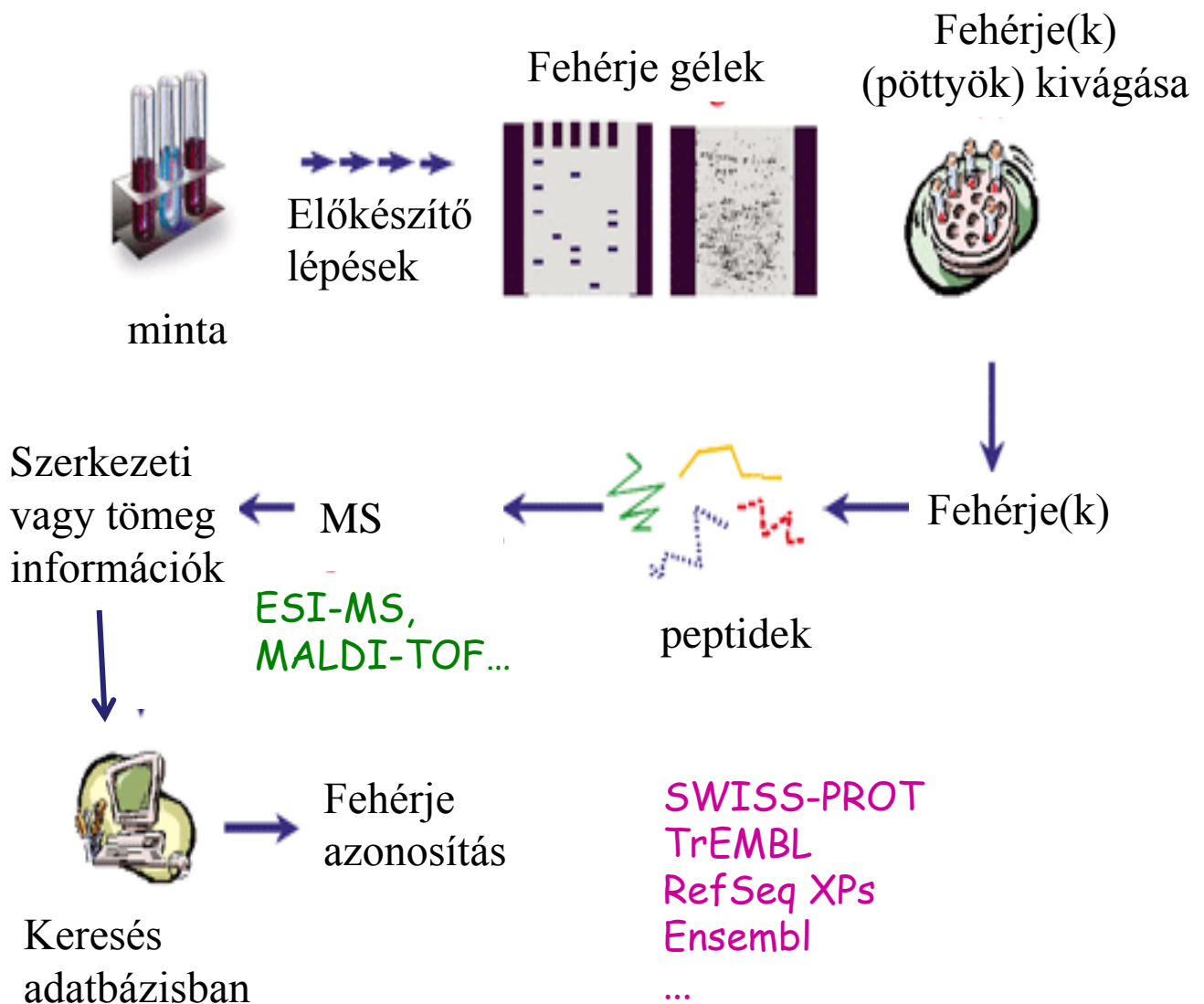


Farrell PHO
(1978)

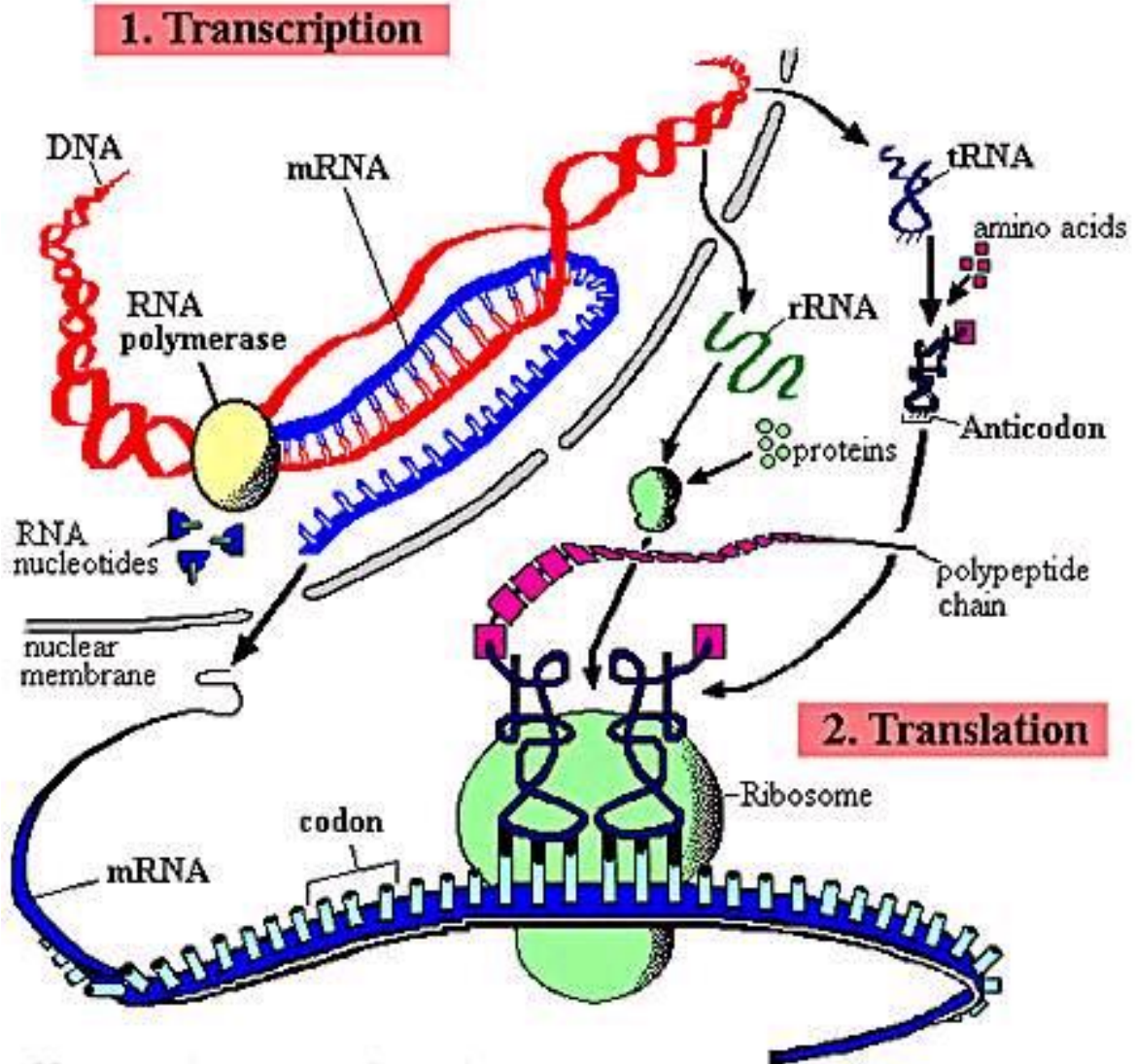
Proteomikai munkafolyamat

- Minta összegyűjtése
- Organellumok szétválasztása
- Tisztítás ellenanyag segítségével

- 1 és 2D gélelektroforézis
- RP-HPLC
- SCX HPLC (ioncserés)



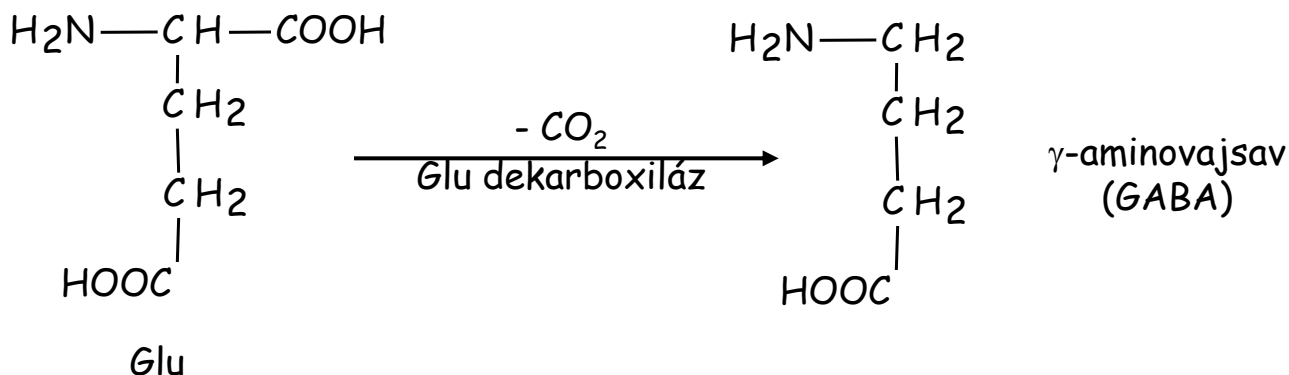
Fehérje bioszintézise



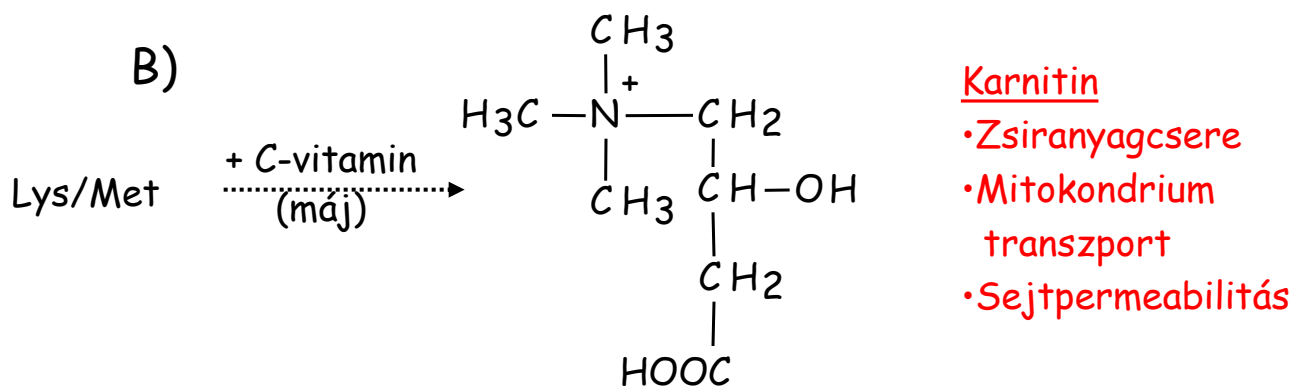
Protein synthesis

Nem fehérje alkotó természetes aminosavak

A)



B)

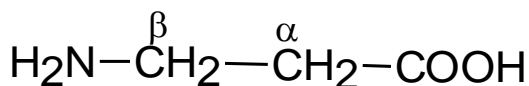


Karnitin

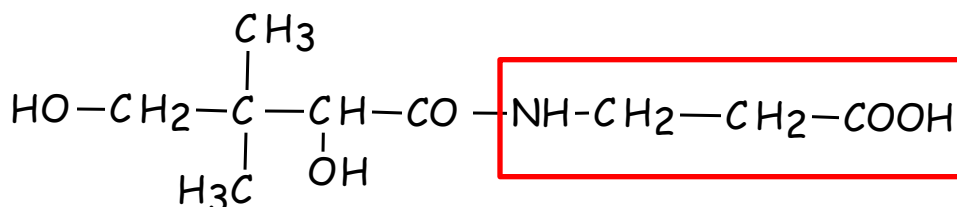
- Zsírsavcsere
- Mitokondrium transzport
- Sejtpermeabilitás

Állat, ember + Növény -

C)

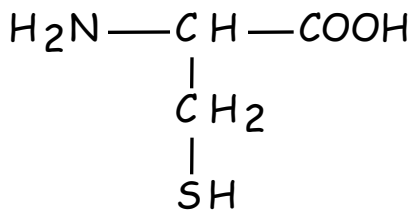


béta-alanin

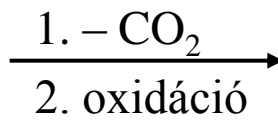


pantoténsav

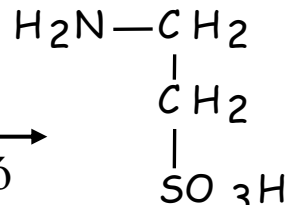
D)



cisztein



(máj, B6)

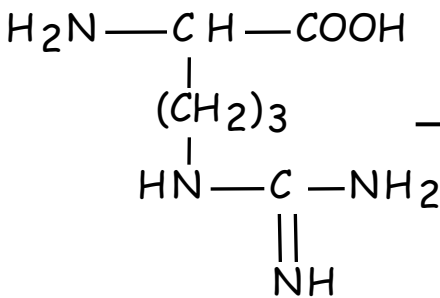


taurin

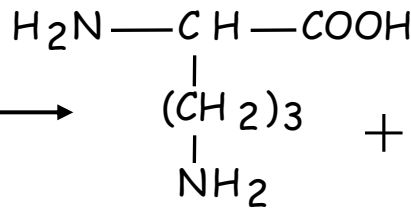
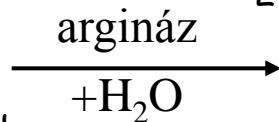
Állat } +
Ember }
Növény -

- epesav alkotórész
- neurotranszmitter
- vérlemezske → migrén?

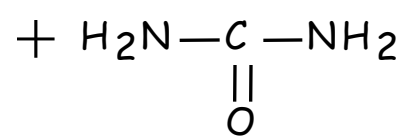
E)



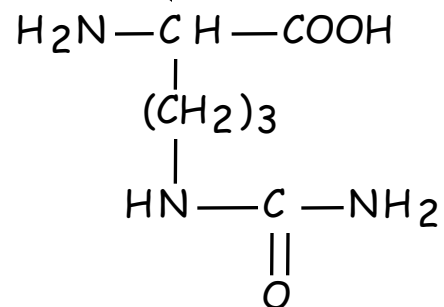
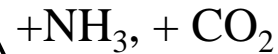
arginin



ornitin



karbamid
(urea)

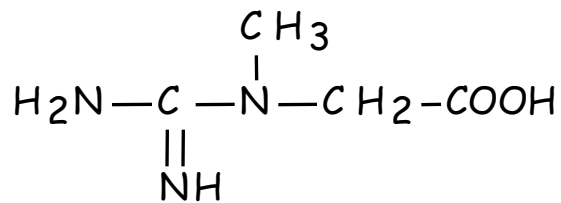
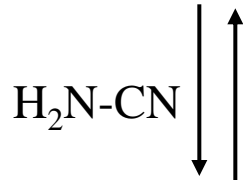
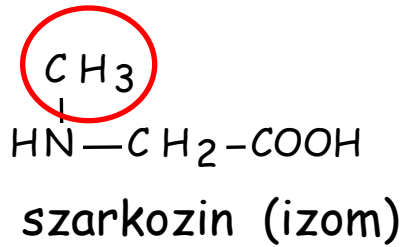


citrullin

(citrullus lat. görögdinnye)

- urea ciklus (máj)
- hagyma, fokhagyma
- detoxifikáció

F)



kreatin . H₂O
(N-metil-guanidino-ecetsav)

op: 303 °C

• izom

• H₂PO₄-NH - (kreatin-foszfát)